### ⑩日本国特許庁(JP)

⑩特許出願公表

# @公表特許公報(A)

平1-503438

個公表 平成1年(1989)11月22日

Int. Cl. 4

識別記号 庁内整理番号

審 査 請 求 未請求 予備審查請求 未請求

部門(区分) 1 (1)

15/00 39/395 7/06 C 12 N A 61 K C 07 K

A-8717-4B ZNA ĀCB -8829-4C Z-8318-4H ×

(全 37 頁)

Ø発明の名称.

~ -t- ....

ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

②特

顧 昭63-503555

6600年 昭63(1988) 3月29日 80翻訳文提出日

昭63(1988)11月30日

89国際出願

PCT/US88/00998

**匈国際公開番号** 

WO88/07543

匈国際公開日 昭63(1988)10月6日

優先権主張

図1987年3月31日図米国(US) 19033,047

勿発 阳 エツジングトン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ アヴェ

ニド ド ラ プラヤ 2362

勿出 願 人

スクリツブス クリニツク ア

アメリカ合衆国 カリフオルニア州 92037 ラ

ジョラ ノース

ンド リサーテ フアウンデー

トーリー パインス ロード 10666

ション

20代 理 人 弁理士 中村 秎 外8名

⑧指 定 国

AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB

(広域特許), 1 T(広域特許), J P, L U(広域特許), NL(広域特許), NO, S E(広域特許)

最終頁に続く

### 浄奇(内容に変更なし) 請求の疑題

- (1) ヒトの組織因子類領タンパク質をコードする構造遺伝子を図 定する配列を含む、わずか約12.000ヌクレオチド塩器対を 含むDNA断片。
- (2) 上記排造遺伝子が、第1図の約1番から約253番の残器で 表わされるナミノ放残益配列を有するタンパク質をコードする、 **請求の範囲(1)記載のDNA断片。**
- (3) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約918番の 塩基で支わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (2) 記載のDNA断片。
- (4) 上記構造遺伝子が、第1図の約1巻から約219番の残器で 表わされるアミノ酸残益配列を有する可溶性ヒト組織因子遺蹟 タンパク質をコードする、精球の範囲(1)記載のDNA斯片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2回の、約130番から約786番の 世去で変わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の疑屈 (4) 記載のDNA断片。
- (6) 上記第1の配列の5 \* 末端に連続し、かつ上記タンパク質の フミノ末端に結合した、アミノ酸残器リーダ配列をコードする 第2の配列も含み、かつ該第1及び第2のDNA配列がヒト組 班因子重貨前監体タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定 義する、請求の疑囲(1)記載のDNA断片。
- (7) 上記律成構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残 基で支わされるアミノ政務器配列を有するタンパク質をコード . する、19 求の範囲(5) 記載のDNA断片。
- (8) 上記湿成構造遺伝子が、第2図の約34巻から約918巻の 世法で去わされるヌクレオチド塩益配列を有する、請求の範囲 (7) 記載のDNA断片。

- (9) 上記浸成構造遺伝子が、第1図の約-32巻から約219巻 の残益で表わされるアミノ位殊益配列を有する、可溶性ヒト組 権因子重領タンパク質的駆体をコードする、請求の範囲(6)紀 取のDNA順件。
- (10)上記提成構造遺伝子が、第2図の約34番から約785番の 世光で歩わされるヌクレオチド塩茶配列を有する、鮭菜の範囲 (9) 記載のDNA断片。
- (11)ヒト組織因子重領タンパク質をコードする精造遺伝子を定義 する第1のDNA断片に機能的に結合したベクターを含む組換 ADNA分子。
- (12)上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残器で 多わされるアミノ管列芸配列を有するタンパク質をコードする。 油水の範囲(11)記数の組換えDNA分子。
- (13)上記構造遺伝子が、第2図の約130番から約918番の塩 古で表わされるヌクレオチド塩杏配列を有する、精水の範囲 (11) 紀成の組換えDNA分子。
- (14)さらに、上記第1の断片の5 / 宋端に連続し、かつ上記タン パク室に結合した、アミノ酸残基リーダー配列をコードし、か つは無1及び無2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体を コードする湿成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(11)記載の
- (15)上記湿应接油遺伝子が、第1図の約-32番から約263番 の残るで表わされるアミノ酸残益紀列に対応するアミノ酸残益 砂湖を有する。上記タンパク質の前期体をコードする。建成の 部開(11)記数の組換えDNA分子。
- (16)上記選成構造遺伝子が、第2回の約34番から約918番の 塩益で表わされるヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチ

F塩器配列を有する、請求の範囲(15)記載の経換えDNA分子。

- (17)上記ペクターが上記第1及び第2のDNA断片の復型を指揮 しうる、持攻の顧問(11)記載の組織表DNA分子。
- (18)上記ベクターが、宿主細胞中、上記タンパク質を発現しうる、 請求の範囲([1])配取の組換えDNA分子。
- (19)上記ベクターが、宿主御贈中、上記的題体タンパク質を発現しうる、細次の範囲(14)記載の経鎖えDNA分子。
- (20)上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記選成構造遺伝子が、可得型の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、第2図の34番から786番の塩器で表わされるスクレオチド配列を有する、建次の範囲(19)記載の組換えDNA分子。
- (21)わずか約50アミノ放残益を含み、かつ、

#### - VNOVITVOIST -.

#### - LYYWKSSSSCKKI -

(22)上記ポリペプチドが、式:

#### H - VHOVYTVOIST - ON

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(23)上記ポリペプチドが、式:

#### B-LYYWESSSSERET-OR

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(24)

からなる野から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位 ポリペプチド類似物。

- (28)上記抗体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、 環の範囲(26)記載の抗体組成物。
- (29) ヒト超機因子重額タンパク質及び第1回の26番から49番の残器で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を度生する、TF8-5G9と命名されたハイブリドーマ。
- (30) 請求の範囲(29) 記載のハイブリドーマにより座生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (31) ヒト組織因子重領タンパク質及び、第1回の第26番から第 49番の残差で示される式で変わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-10H10と命名された、 ハイブリドーマ。
- (32) 請求の範囲(31) 記載のハイプリドーマにより歴史される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (33) ヒト組織因子重領及び、第1図の第146番から第167番 で示される式で変わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分 子を産生する、TP9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。
- (34) 請求の範囲(33)記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (35)a)身体サンプルを、ヒト組織因子重領タンパク質と混合し、 免疫反応混合物を作る;
  - b) この複合物を、上記抗体がサンプル中に存在するとト組織 因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な時
  - c)ステップb) で生成した免疫反応盈物の存在を検定する、 以上、a) ~ c) のステップを含む、体液サンプル中のヒト組 襟因子重額タンパク質の存在を検定する方法。

(23.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位 ポリペプチド類似物。

- (26)a)ヒト組織因子重領タンパク質と免疫反応し、
  - 61

からなる群から選ばれた式で変わされるポリペプチドと免 疫反応し、かつ

- c) 第1回の第204番から第226番の部位で示される式 で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、 抗体分子を含む、抗体組成物。
- (27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の組成物。
- (36)a)生理学的に許容しうる希釈列及び、血性中に存在するヒト 組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合 した、ハイブリドーマTF9-10810によって痩生さ れる、ある量の抗体分子を合むモノクローナル抗体組成物 を被検者に診験投与する:
  - b)上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血栓の一部 として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応 度物を形成するのに十分か、予め決められた時間維持する;
  - c)ステップb) で生成した免疫反応重物の存在を検定する、 以上、a) ~ c) のステップを含む生体内の血栓を検出する方 法。
- (87)存在するとト組織因子と効率よく結合する、TF8-5C9 及びTF9-6B4からなる癖から選らんだハイブリドーマに よって度生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許 等される常釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検体 に静脉投与することを含む、生体内におけるとト組織因子の脊 血因子ほどは への結合能を中和する方法。
- (38)組成物中、因子VI/VI ≥ と効率的に結合する量の、

からなる耳から返ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に 許容された特別形を含むポリペプチド組成物を被検者に静原投 与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の森血因子は /VI a への結合を顕著する方法。

(39)』) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

を含むサンプル中に存在するとり組織因子重額タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした診断システム。

- (40)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、
  - a) TF8~5G9~
  - b) TF9-6B4.
  - c) TF9-10H10

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲(39)記載の診断システム。

- (41) e) サンプルモ、固体マトリックスに固定した、請求の範囲 (15) 記載のよりペプチドを含む固体サポートと混合しい結合反応混合物とする。
  - b)上記結合反応混合物を、上記凝血因子が上記まりペプチ ドと結合し、固相複合体及び上滑を形成するのに十分な時 間線持する。
  - c) 上記復合体から上記上清を分離する、及び
  - d) ステップ c) の分離した複合体から、上記器血因子を回収する、

以上、a) ~ d) のステップを含む、サンブルから血液凝固因子ピノVIaを早離する方法。

- (42)実質的に、ヒト組織因子軽度タンパク質を含まない生理学的 活性のあるヒト組織因子重質タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (43)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重領タンパク賞を、リン脳質中に分散させた、脚水の範囲(42)記載の組成物。
- (44)上記得版が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(42) 記載の組成物。
- (45)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1者から 第219番の部位で表わされるアミノ放残器配列を有する、論

求の距回(42)記載の組成物。

- ((65)a)少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子軽額タンパク質を含まない、生物学的磁性のあるヒト組織因子重額タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ、
- を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を検定するキットの形をした診断システム。
- (47)上記意質タンパク質がリン証實中に分散している、対求の疑 囲(46)記載の診断システム。
- (48)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1者から 第219号の部位で表わされるアミノ放残器配列を有する、跨 求の範囲(46)記載の診断システム。
- (49) a) とト組港因子登録タンパク質をコードする構造遺伝子を定 聴する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続し ており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ散発器リ ーダー配列をコードする第2のDNA断片で、放第1及び 第2のDNA断片合せて上記タンパク質の削額体をコード する混成構造遺伝子を定しているDNA断片と機能的に結 合する、ホ乳質用酶に適合する発現ペクターを含む組換え DNA分子でトランスホームしたホ乳質細胞の栄養物地で の複奏を開始する;
  - b)上記培養物を上記細胞が上記組換え DNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして
- c)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する、 以上、a) ~ c) のステップを含む、成熟と b 組織因子置質タンパク質の開製方法。

(50)上記述成構造遺伝子が、第2図の第34番から第786番の 塩苗で表わされるヌクレオチド塩器配列を有する、請求の範囲 (49)記載の方法。

- (51) 請求の範囲(49) 記載の方法により産生した、成熟ヒト組織因子重領タンパク質を基本的に含む組成物。
- (52) 請求の顧囲(50) 記載の方法により産生した収熱にト組織因子 糞鎮タンパク質を基本的に含む組成物。
- (53)ハイブリドーマTF8-5G9により産生される抗体分子を、 投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量合 有する、生理学的に許容された希釈剤を含む、モノクローナル 抗体組成物を、被検者に静原投与することを含む、ヒト組織因 子の、森血関始能を中和する方法。
- (54) ヒト観線因子遺譲タンパク質及び、第1回の第26番から第 49番の残骸で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を度生する、TF9-5B7と命名されたハイブリドーマ。
- (55)請求の範囲(54)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (55)ハイブリドーマTF9-5B7により産生される抗体分子を 含有する生理学的に許容された特別刑を合む治療に効果的な量 のモノクローナル抗体組成物を、被検者に投与することを含む、 ヒト組織因子の職血開始能を中和する方法。
- (57)a)とト組織因子無鎖タンパク質と免疫反応し、それにより、 はタンパク質の因子VL/VLaへの結合能を阻害し、かつ

することを含む凝血を阻害する方法。

(58)上記抗体分子がさらに、ヒト組織因子と免疫反応を起こすことを特徴とする、特求の範囲(57)記載の方法。

### 沙奇(内容に変更なし) 明 昭 書

ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ ポリペプチド及び抗体

#### (本出頭の関連文献)

本出版は、1987年3月31日に出頭された米国出頭第033.047号及び1987年6月25日に出頭された出頭第067.103号の部分雑誌出頭である。

#### (技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重領タンパク質(h n T F h)をコードする構造遺伝子を有する超換え D N A 分子(r D N A)に関し、より詳細には、本発明は、宿主細胞中に含まれる、h n T F h を発現しうる発現ペクターに関するものである。また、本発明は h n T F h の合成ポリペプチド類似物及び h n T F h 及びはポリペプチド類似物及び h n T F h 及びはポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関する。

#### (発明の背景)

凝血は、一耳の凝無因子として知られる細胞性及び血器性タンパク質によって仲介される、一連の、解禁、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケードの開始は、観機因子(TF)として知られる細胞性レセプターが、凝集因子以又はその誘導体、因子可。と結合し、触媒的に活性のある複合体を形成したときに起こる。TFの非存在下、及び複合体への連続する結合がない場合には、U/Uaは凝集を開始しない。従って、TFの化学的かつ生化学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、適常領域器中で可溶化しておらず、また、因子リ ノセ。及び他の凝集因子を含む血法タンパク質と接触できないこ とが分っている、既に結合した練タンパク質である。組織因子は

混合物の昇面活性利及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン( Penerson ), ジャーナル・オブ・クリニカル・インペスチゲーション( J. Clin. Invest. ) 4 7 ~ 7 2 頁(1958); ネマーソン( Fanerson ), ジャーナル・オブ・クリニカル・インペスチゲーション( J. Clin. Invest. ) 4 8 ~ 3 2 2 頁(1969 年); 及びカーソン( Carson )等、サイエンス( Sclence ) 、 2 0 8 巻、3 0 7 頁(1980年) 参照。

早離した、もしくは、再腹質化したTF含有タンパク質関重物は、数々の確の組織から抽出物によって調要した。組織因子は、 天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。 古典的方法のレヴェーとしては、ネマーソン(Reserson) 等の 報告(プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンボシス (Pros. Res. Thros.) 5巻、237~261頁(1982年) を参照せよ。

最近、プローズ(Broze)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Blol. Chea.)260巻、10917~20(1985年)) ボム(Bon)等(トロンボ・リサーチ(Thromb. Res.)42巻、635~643頁(1986年)及びグハ(Guha)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nati. Acad. Sci.)USA83巻、299~302頁(1986年))は、脱路質化組括因子タンパク質を、非イオン性界面括性形及びCaCs。を含む水溶性溶液に溶かした時、筋タンパク質が因子物ノVIaと結合するという発見に高づいた方注を用いて、ヒトの組織因子(buff)タンパク質を単脳したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単脳したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単脳したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単脳したことを報告している。これ

適常、血管を形成している初数の表面上には発現されていないが、血管中の単球によるその発現は、ベクテリアのリポ多様のような 座染性試解成分、ある抗原により対微されたTへルベー細胞から 誘導され、直接的にはある刺激されたTへルベー細胞由来のリン ホカイン及び免疫複合体によって誘導することができる。例えば ベクテリアのリポ多様同様、インターロイキン1及び直痛壊死因 子アルファのような単細胞/マクロファージのある炎症仲介物は 血球の体液例表面にTFを発現する内皮細胞を刺激することができる。 典型的に、血管要素におけるTFの発現は、拡大する血管 内嚢血又は、局部的な森血の開始、すなわち血栓形成を起こす。

組織因子は、試験管内の繊維芽細胞を含む培養物中のある血管 外細胞、未同定型の脳細胞及び基底膜パリヤーにより、循環する 血無タンパク質から分離されている上皮細胞の表面上に排成的に 免現される。これら細胞上のTFの存在は、組織損傷の結果として の血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、森血 システムが開始する基礎である。

ハウウェル(Bowell) (アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(Am. J. Physiol.) 31 巻1 頁(1912年))の弱告は、アドを合む単離した超流タンパク質問題物は、リン脂質ータンパク質(リポタンパク質) 複合体として存在するときのみる 無を促進することができることを示す最初の報告である。 典型の に、 TF 合有組織タンパク質の単離が、通常 TF タンパク質 と今 しているリン歴質を除去してしまうので、早難したタンパク質を再踏気化することによる TF の複雑的プロコアグラント活性の再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多くの研究 が必要によって行なわれてきている。例えば、番集活性の回復に、リン 脚質のタイプ、タンパク質に対するリン 腱質のタイプ、タンパク質に対するリン 腱質のタイプ、タンパク質に対するリン 腱質のタイプ、タンパク質に対するリン 腱質のタイプ、タンパク質に対するリン 腱質のタイプ、タンパク質に対するリン 腱質のタイプ、タンパク質に対するリン 腱質のタイプ、タンパク質に対するリン 腱質の

ら方法の使用は、有准量の単階は/VI a を入手することの関単性 のみならず、因子VI / VI a の不安定性によっても制限される。

プローズ等(上記)は、AuTFに特異的なモノクローナル抗体の関発及び免疫費和性吸着体としてのそれらの使用は、因子VI/VIIIを使用の制限によって起こる問題を回避できることを指達している。しかし、抗ーAuTFモノクローナル抗体は、放文献中には報告されていない。さらに、子牛のTFによって生じる2つのモノクローナル抗体(カーソン(Caraos)等、ブラッド(Blood)、662巻156頁(1985年))は、AuTFとは免疫反応を起こさない(グハ(Gaba)等、上記)。

## (本発明の概要)

1 つの賠標において、本発明は、ヒトの組織因子宣領(buTFb) タンパク質をコードする構造達伝子を限定する配列を含む、わず か約12.000塩基料を含む DNA断片を考案している。協構造 遺伝子が、第1回の約1者から約263番で示されているアミノ 及残益を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さ らに、該構造達伝子は、第2回の約130番から、約918番で 示されるヌクレオチド塩基配列を有することが好ましい。

翌ましい般後においては、そのDNA断片は、第1の配列の5・来端と連続し、かつ、huTFhタンパク質のアミノ来端に結合したアミノ放張券リーダー配列をコードする第2の配列そも含む。その第1及び第2のDNA配列は一緒になって、ヒトの組織因子重額前額体(ブレカuTFh)タンパク質をコードする温成構造遺伝子を定義している。族流成構造遺伝子は第1図の約~32番から約263番で示されるアミノ放残高を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、旋流成構造遺伝子は、第2図の約34番から約918番のスクレオチド塩器配列を

.

有することが望ましい。

別の監視において、本発明は、ヒトの組織因子重領ケンパク質をコードする1つの構造退伝子を定義する第1のDNA所片と機能的に結合したペクターを含む組換えDNA分子も考定している。さらに接組換えDNA分子は、第1の断片の5・末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ監及器リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一緒になって、上記タンパク質の前駆作をコードする混成構成遺伝子を定義している。

別の厳敬において、本発明は、わずか約50アミノ散残器を含み、かつ式

#### - VNQVYT-

で要わされる配列に相当するアミノ放残益配列を含むヒトの組織 因子結合館位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに好ましくは、本発明はわずか約5 B プミノ放残器を合み、 かつ

#### - VNOVYTBOIST - . .

#### - LYYWKSSSSCKKT -

からなる耳から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ 放残器を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考 窓している。

さらに本発明の駐機には、

a) ヒトの組織因子重額タンパク質と免疫反応する。

**b**)

点た、本発明は、

- a) 生理学的に許容される希釈剤及び効果的な生体内指示手段と 結合させたハイブリドーマTF9-10H10によって作られ たある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者 に静脈注射により投与し、血栓中に存在するヒトの組織因子と 免疫反応させる、
- b) 協抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子 と免疫反応し、かつ、免疫反応物質を形成するのに十分な時間、 その投与を受けた被検督を維持する。
- c) ステップb) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する。 以上ョ) ~ c) のステップを含む、生体内で血栓を検出する方法 も考案した。

さらに、本発明は、TF8-5G9及びTF9-5B6からなる群から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在するとトの組織因子と効率よく結合する、ある量の抗体分子を含む生理学的に許容される希釈剤を含有するモノクローナル抗体組成物を、被検者に静原住材によっと没与することを含む、生体内で、凝集因子8/Maと結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考案している。

また、本発明は、因子などは』と反応するのに有効な量の、

その抗体組成物は、 ■) T F 8 − 5 G 9 。

c) TF9-10H10.

4) TF9-5B7.

· b) TF9-6B4.

からなるハイブリドーマの野から遅ばれたハイブリドーマにより 生度されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

る布駅剤を含有するポリペプチド組成物を、静脈注射で被検者に

投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、凝集因子は

別の旅機において、本発明は、本発明の抗体観放物を含有する

パッケージを含む、試料中のヒトの組織因子重貨タンパク質の存

在を検定する、キットの形をとった比断システムを考案している。

/VI = に結合することを阻害する方法を考案している。

また、試料から血液器無因子リンVIaを単離する方法も考案された。

この方法は、

- a) 固体マトリックスに固定した、排栄項15記載のポリペプチ ドを含む固体サポートと試料を混合することにより結合反応提 合物を作る、
- b)上記結合反応混合物を、上記職無因子が上記ポリペプチドと 結合し、固体複合体及び上情を作るのに十分な時間、維持する、
- c) 上記複合体から、上記上清を分離する、そして
- d) ステップ c の分離した複合体から、上記裔集因子を回収する、以上、 a )~ d) のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの組織因子軽額タンパク質を含まない、 生物学的に活性のあるヒトの組織因子重額タンパク質の水溶液を 含む組成物を考案した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因

からなる耳から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

からなる群から選択される式で表わされるポリペプチドと免疫 反応する、

c) 実質的に第1回の部位204から部位226で示される式で 表わされるポリペプチドとは免疫反応しない、

抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマTF8-5 C S 、TF9-10 H 1 O、TF9-5 B 7 及びTF3-6 B 4 と、それらハイ ブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗 体組成物を考定している。

本杂明世。

- ) 身体試料を、ヒトの組織因子重額タンパク質と混合し、免疫 ・反応混合物を作る。
- b) その複合物を、抗体が、そのは料中に存在するヒトの組織因 子と免疫反応し、免疫反応度物を作るのに十分な時間維持する、 そして、
- c) ステップb) で生じた免疫反応度物の存在を検出する、 以上のステップを含む体液試料中のヒトの組織因子環鎖タンパク 質の存在を検定する方法も失気している。

子重領タンパク質は、リン酸質又は、非イオン性界面密性剤中に 分散されていることが望ましい。

血管系統体状料中の最無能力を検定するための、キットの形を とった診断システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織 因子軽慎タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うの に十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重鎮タン パク質の水溶液組成物を含有するパッケージを含む。その重領タンパク質は、リン脳質中に分散されていることが望ましい。

別の意味において、成熟したヒトの組織因子重領タンパク質の 調製性及びその方法によるタンパク質発現産物も考案されている。 この方法は、

- a) 栄養培地中、ヒトの組織因子重額タンパク質をコードする精 遠遠伝子を定義する第1のDNA断片及びその第1の断片に連 続し、かつ、上記タンパク質に付除するするノ酸残器リーダー 配列をコードする第2のDNA断片と確認的に結合し、宿主ホ 乳類細胞と適合する発現ペクターで、上記第1及び第2のDNA 断片が上記タンパク質の前駆体型をコードする茂成構造遺伝子 を定義するものであるようなペクターを含む組換えDNA分子 でトランスホームした宿主水乳類細胞の培養を開始する。
- b) その培養物を、上記細胞が、上記組換え DNA分子からタンパク質を発現し、かつ、上記成剤型のタンパク質を形成するのに十分な時間維持する、そして、
- c)上記培養物から、上記成熟型のタンパク質を回収する、以上a)~c)のステップを含む。

図式の簡単な疑察

図式は本公開の一部を形成している。

第1図は、1文字アミノ酸残差コードを用い、左から右に、ア

トン (k) で示した見かけの分子量をもつ分子量機均衡質を示している。

第5回は、15%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、
因子切グリョの観和性で単離したカロアドのオートフルオログラムを示している。カロアドの単離、パットによるラベル化及び電気泳動は、例4と同様に行った。レーン人は、DTTによる還元はの単離したカロアドを示している。レーンBは、DTT運元なして、電気泳動した同サンプルを示している。上のパンド及びよ7をの大きさのカロアドに対応している。オートフルオログラフィー後、上のパンド及び下のパンドを切り出し、DTTを含むSDSサンプルパッファ中で再次和し、第2の15%アクリルナミドゲルのサンプルのフェルに入れ、電気泳動した。レーンCは、レーンBから得られた、下のパンドの再電気泳動の結果を示している。ルーンDは、レーンBから得られた上のパンドの再電気泳動の結果を示している。125及び47キログルトン(x)の見かけ上の分、子量をもつタンパク質が矢印で示されている。

第6回は、例4で設明されているように、まずhuTF特異的モノクローナル抗体で免疫は酸化し、ついで8~17%のポリアクリルアミド勾配ゲルで電気泳動した、因子なノ切3の製和性で早間したhuTPのオートフルオログラムを示している。レーンAは、DTTによる違元を伴う、電気泳動した1371ラベル化huTPを示している。レーンBは、違元なしで電気泳動した同サンブルを示している。

第7図は、15%アクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子 ログリョの見和性で単類したAuTFのオートフルオログラムを 示している。単類、\*\*\*」によるラベル化、還元及び良グリコシ ミノ末端からカルホボキシ末端の方向で、ヒトの組織因子重領タンパク質の成熟型及び制理体(各々、 h u T F h 及びプレbuffb)の完全なアミノ散残器配列を示している。主な天然の成熟型タンパク質のアミノ散残器配列は、1番から263番に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ散残器から始言り、263番の残器で終わる。成熟プロセスで放棄されるリーダー配列(前駆体領域)に相当するアミノ散疫器配列は、マイナス番号で示した。細胞外ドノイン及びトランスメンプレン・アンカー領域は各々、部位1~219及び220~242に対応する。

第2回は、1文字ヌクレオチド塩基コードを用い、左から右に5、末端から3、末端の方向で、プレカロTPN及びNロTFNタンパク質をコードする、cDNAのヌクレオチド配列を示している。NロTFNの領流遺伝子は塩基130から始まり、塩器918で休わる。

その読み枠は、各アミノ酸を示す1文字を、対応するコドンの 中央の電話上に置くやり方で、ヌクレオチド配列の上に推察され るアミノ酸残器を付置することにより示した。

第3回は、例2で説明されている、トロTFの凝血活性を測定するのに用いる、凝集検定を示す図である。同対数プロットは、 むともリリットル当りのピコグラムで変わしたヒトの組織因子 (トロTF) 環度で示される、ヒトのクエン酸化血素凝集(凝血) 時間を示したものである。

第4図は、10 % ポリアクリルアミドゲル中で電気体動した、 因子リノリョ製和性で単離した h u T F h のオートフルオログラムを示している。レーンA は、例 4 で説明されているように、単 離され、電気泳動前に、ジテオスレイトール (D T T) で違元した。125 J ラベル化 h u T F を示している。レーンB は、キロダル

ル化は、例4で説明されているように行った。レーン1は、キロダルトンで要わされた見かけ上の分子量をもつ複準物質として電気泳動したタンパク質復識物質:リゾチーム、14.3;カルボニック・アンヒドラーゼ、30.0;オパルブミン、46.0;ウシュ清アルブミン、69.0;ホスよりラーゼも、92.5;ミオシン、200.0(オペて11州、アーリントンハイツ・アマーシャム社より入手)を示している。"\*\*!ートロTFを含むサンブルをDT丁存在下(レーン2及び3)又は非存在下(レーン4及び5)で環気泳動した。これら\*\*\*」ートロTF含有サンブルのいくつかは電気泳動的に脱グリコシル化し(レーン3及び5)、他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び4)。

レーン 3 及び 5 に渡した<sup>198</sup> J ー A ロ TF 含有サンプルは、電 気泳動前に脱グリコシル化され、レーン 2 及び 4 のものは脱グリ コシル化しなかった。

第8回は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、免疫視和性で単離されたbeTFのオートフルオログラムを示してい。レーン1は、キロダルトンで表わされる見かけの分子量をもつ、マーカーとして電気泳動した選挙タンパク質:チトクロムC、124:ラクトグロブリン、184:カルボニック・アンヒドラーゼ、290;ラクテート・デヒドロゲナーゼ、36.0:オパルブミン、430:グルタメート・デヒドロゲナーゼ、55.0;及びホスホリラーゼも、95.5(全て、M人州ニュートンセンターのディバーシファィド・バィオテク(Diversified Biotech.)から入手した)を含んでいる。

レーン 2 は、スミス( Smith ) 等の B C A タンパク質検定法 (アナリティカル・パイオケミストリー( Abai, bioches, )150 巻、 7 6~ 8 5 頁(1 9 8 5 年))を用いて測定し、かつDTT

### 特表平1-503438(**7)**

を用いて選元した約20μ8のタンパク賞を含んでいる。huff 建賃(huffh)は、明らかに、およそ47Mrの位置に確認 され、huff軽額は、およそ125Mrの位置にわずかに確認 された。タンパク質は、レムリ(Leanil)(ネイチャー(Mature)、 227地、680~685頁(1970))の報告に述がい、コ マージ・ブルー染色により可復化した。

第9図は、huTFhの非リン語質化(非語質化)ポリペプチド類似物による、 $huTF由来の凝集開始阻害の投与・応答曲線を示すグラフである。 機々の機度の非器質化ポリペプチドによる凝集阻害率は、例12に健弱されているように測定した。チストしたポリペプチドは、<math>p26-49(\Delta TF26.49)$ 、p121-155(O、TF121、155)、<math>p146-167(Φ、TF146、167)及びp204-226(環、TF204、226)である。

第10図は、boTFhのリン暦質化した (歴質化した) ポリ ペプチド類似物による、hoTF由来の凝集弱効照客に関する投 年一応答曲線を示すグラフである。その阻害率は例9で投明され ているように、関方法により、両類似物に対して測定した。

第11回は、超換えDNAプラスをドPCTF64、PCTF314及びPCTF403内のEcoRI所片挿入物の制限地図を示したものである。その挿入物(トーー)は、プレカロTF内遺伝子の完全なヌクレオチド配列に対応する重複するヌクレオチド配列領域を示している。別に、その挿入物は、第2回で示されている、残器1~486(PCTF64に含まれている)、残器135~775(PCTF314に含まれている)、及び残器775~1125(PCTF403に含まれている)由来のヌクレオチドに対応するヌクレオチド配列を、左から右に5°から

例19に述べられているように測定した。白丸(O)はTFB-5C9抗体を示し、暴丸(●)は無関係の抗体を示している。

第16図は、抗丁ドモノクローナル抗体丁ド8-5G8による特製したヒトの脳丁ドの凝血活性の阻害を示している。リン設質ベンクル中に再構成された、特製したヒトの脳丁ドの凝血活性は、種々の濃度の特製IsGと、37℃30分間、前処理した後別定した。丸は、抗丁ド抗体丁ド8-5G9に対するもので、三角は、無関係なコントロール抗体ドムト100に対する国客率として表わされている。

第17図は、精製した抗丁ドモノクローナル抗体で処理した、 培養されたJ82膝脱がん細胞に対する阻害因子はの結合及び、 その細胞による因子メョの形成を示している。因子メョの形成中 の阻害の値は、三角で表わされ、因子はの結合阻害の値は、丸で 表わされている。データは、抗体を加えないでインキュペートし た細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パ ネルAは抗体丁ド9-2C(の効果、パネルBは、抗体丁ド9-5 B 7 の効果を示している。

3 \* の方向で含んでいる。また、例1 6 で述べられている彼々の 組換えDNA分子を構築するのに用いられた神入物内の制限酵素 切断部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示 されるリーダーペプチド(下三)及びトランスメンプレン・ア ンカードメイン(2000)をもつプレトッTドトタンパク質のお よその位置も示してある。

第12図は、トロTFトの非リン語質化(非路質化)ポリペプチド類似物による、トロTF由来の凝集開始の阻害を示す、投与一応答曲級のグラフである。モル傷度で変わした権々の構度の非勝質化ポリペプチドによる凝集の阻害事(%)は、例12に述べられているように測定した。試験したポリペプチドは、p24~35(△)、p26~49(○)、p152~169(□)及びペプチドp40~71、p72~104、p94~123及びp161189であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、無約的に異丸(●)で示した。

類13回は、TF8-5G9抗体組成物による凝集図客の速度 論を示すグラフである。延集の図客率(34)は、例18で述べら れているように測定された様々の抗体免疫反応時間にわたってプ ロットしてある。

第14回は、カロアド由来の数集の抗トロアド抗体による阻害 の投与一応答を示すグラフである。 補 \* の確定の抗トロアドモノ クローナル抗体アド8-5G9による番集の阻害率 (火) は例 19に述べられているように無食した。

第15回は、カップ下級がヒトの総数券組設系列GM1381の組設設議物である、カップ下由来の飛風の、抗トップ下抗体による監客の投与一応答のグラフである。様々の境度の抗トップドモノクローナル抗体で下8-5G9による最低の服务率(M)は、

泳動的にニトロセルロースに移した。このようにして作ったウェスタン・ブロットを0.2 μg/mgの観和性精製したウサギ抗トロTP 1gG (パネルA)、1 μg/mgのウサギ抗ヘモグロビン1 gG (パネルB) 又は、1 μg/mgの非免疫ウサギ1gg (パネルC) と免疫反応させた。免疫染色したバンドの見かけの分子量を右に k D m で示した。

### 発明の詳細な説明

### A. 定義

アミノ酸 : ここで同定される全てのアミノ酸は、天然のL-型のものである。 構体的ポリペプチド 命名法に従がい (ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chee.)、243 生、3557~59頁(1969))、アミノ散残器の時号は、 次の服会変に示されているとおりである。

要边仗

12	7	アミノ数
上文主	ま文主	•
Y	Tyr	チロシン
G	G 17	グリシン
F	P he	フェニルアラニン
м	Met	メチオニン
A	Ala	フラニン
s	Ser	セリン
L	11.	イソロイシン
L	Les	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	V = 1	ベリン
P	Pro	プロリン

к	Lys	リジン
H	H i a	グルタミン
a	Gla	グルタミン
E	G 1 e	グルタミン酸
w	Trp	トリプトファン
R	Are	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Ass	アスパラギン
С	Суз	システィン

ここでは、全てのアミノ改配列は、従来とおり左から右に、アミノ政末端からカルボキシ末端への方向で示されていることに往 本を望する。さらに、アミノ政残益配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH(水素及び 水改善)のようなラジカルへの結合、もしくは、ボリベブチド領における1から約15残器の1つ以上のアミノ政務公配列を示している。

ポリペプチド及びペプチド:ポリペプチド及びペプチドはここでは、臍合う残器のアルファアミノ番とカルポキシル器の間のペプチド結合により互いに直鎖的に結合した、わずか約50アミノ 改残器を意味するものとして互換的に用いられている。

タンパク質:タンパク質は、ポリペプチドのように互いに直接 的に結合した50以上のアミノ酸残差を意味して用いられている。 ヌクレオチド: 糖部分 (ペントース)、リン酸及び窒素 ペテロ 環境 添からなる DNA 又は RNA の単量 体ユニット。この塩差は グリコシド炭素 (ペントースの1、炭素)を介して糖部分と結合 しており、塩基と糖の組合せはヌクレオシドと呼ばれる。ヌクレ オシドがペントースの3、又は5、部位に結合するリン酸基を会

パク質をコードする構造運伝子を形成するDNA配列がDNA断 片中に含まれることが選ましい。その遺伝子はhuTFh又はプレhuTFhタンパク質中にあるアミノ酸残器をコードする各コ ドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロンを含まない遺伝子であることが好ましい。

従って、第2図に示される、5′末端の約130番から、3′末端の約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、beIFbを発現することができるDNA断片が本発明のI版機を構成している。第2図に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、プレカロTPbを発現できるDNA断片が、本発明のもう1つの態機を構成している。

好ましい、可得性のカロTPカ分子は、カロTFカをコードするDNAの5、末端の約150塩茶によってコードされるアミノ 放残器を欠いている。はって、第2団で示される、5、末端の約130番から約756番を経由して、3、末端の約801番の節位までの配列を搭本的に合み、かつ、可溶性のカロTFトを発現できるDNA断片は、本発明のさらに好ましい放復を構成する。可溶性のカロTPカ構造遺伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2団で示されている、約130番から約756番約130番から約771番、約130番から約786番、及び約130番から約801番で表わされるヌクレナチド配列を有するものである。

可得性プレカロTFカをコードする、好にしいDN人断片は、それらが、第1図で示されるように、-32巻から0巻までのアミノ験残萎で示されるような、アミノ末端リーダー配列を含むタンパク質をコードしていること以外は、可得性カロTFカをコードしているものと同じてある。従って、可得性プレーカロTFカ

むとき、それをヌクレオチドと呼ぶ。

堪基対(bp): 二本額DNA分子内でのアデニン(A)とチミン(T)又はシトシン(C)とグアニン(G)の組合せ。 B. DNA断片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列は 遠伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造遺伝子 のデオキシリボ核酸 (DNA) 配列に直接関係づけられる。従っ て、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチ ドのアミノ酸残差配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コートの性質にリダングンシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミソ政に対し、1つ以上のコードするヌクレオチド・トリプレット(コドン)が、1つのアミノ政務器をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ政務器配列をコードするのに多くの異なるヌクレオチド配列が存在することになる。そのようなヌクレオチド配列が存在することになる。そのようなヌクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ政務器配列を生産することが可能なので、機能的には特価であると考えられている。場合によっては、プリン又はピリミジンのメチル化物がスクレオチド配列の中に超込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重領タンパク質(hulfh)をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい監技において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重額前駆体タンパク質(プレルロTFh)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、huTFh、また、より好をしくは、プレーhuTPhの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可容性のhuTPh又は可容性のプレーhuTPhタン

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、 基本的に、第2図で示されている5°未端の約3 4 巻から7 5 6 巻を経由して、3°来端の約8 0 1 巻で示される配列を含んでい る。典型的な好をしい可容性のプレトロTF AコードのDNA断 片とは、第2図で示されているところの、約3 4 巻から約7 5 6 巻、約3 4 巻から約7 7 1 巻、約3 4 巻から約7 8 6 番及び約 3 4 巻から約8 0 1 巻のヌクレオチド塩益配列を有するものであ

可溶型も含めて、上記カロTFカ及びプレカロTFカタンパク 質をコードする相同的DNA及びRNAも先に協議したように考 高された。

AuTFh及びプレトuTFhをコードするDNA断片は化学的技術、例えばマテウシ(Natioucci)等のホスホトリエステル法(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー、(J. Aa. Chea. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成できる。(ここで引用されている技術の公開は参考として超込まれている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより未来のアミノ酸残器配列をコードする代りに適当な場合を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2回に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的に A u T F 及びプレ A u T F A タンパク賞をコードする構造遺伝子を含む D N A 断片は、これらの遺伝子を含む 組換え D N A 分子から得ることができる。例えば、プラスミドタイプの組換え D N A 分子 p C T F 6 4、 p C T F 3 1 4 及びpCTF 4 0 3 はいずれも h u T F h 及びプレ h u T F h タンパク質の異なる領域をコードする D N A 配列を含んでおり、また、これらを 合せると、各タンパク質を発現するのに必要な全てのDNA 配列を有することになる。各々、pCTF64、pCTF314又はpCTF403でトランスホームした大路間の均乗物は、1987年3月27日、ブダペスト協定に基づき、MD州、ロックビル、パークローン、ドライブ12301番、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受理番号67370、67368及び67369が割当てられた。

トロTFト又はプレトロTFトをコードするDNA配列を含むDNA既片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスをドからの適当な制限断片を概能的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発列のDNA分子は、枯寒末端、すなわちこの分子の二本領領域を越えて伸びた。突き出した。一本領領域をもっている。本発明のDNA分子上に枯寒末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なりボ核酸(RNA)も今 窓している。

### C. 組換えDNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに機能的に結合することにより作ることができる。

パイオラド・ラボラトリーズ社)及びpPL、pKK223(NJ 州、ピスカタウェイ、ファルマシア社)がある。

真技細胞、好きしくは脊椎生物細胞と適合する発現ベクターも、 本発明の超換えDNA分子を作るのに用いられる。 真技細胞発現 ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されてい る。 典型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿 入に便利な例限部位を含んでいる。これらのベクターの典型的な ものには、pSUL及びpKSV-10(ファルマシア社)、 pBPV-1/pML2d(インターナショナルベイオテクノロ ジー社)及びpTDT1(ATCC、#31255)がある。

好ましい賠損において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる実体性和防発現ベクターは、実体性和防中で効果的な選択マーカー、好ましくは、薬剤耐性選択マーカーを含んでいる。好ましい薬剤耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo) 遺伝子である。サウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Bol. Appl. Senet.)1 巻、327~341頁(1982年)。

本発明の r D N A を作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考案されている。ここで用いられているように、 \* レトロウイルス発現ベクター \* とは; レトロウイルスゲノムのロング・ターミナル・リピート (LTR) 領域由来のプロモーター配列を含む D N A 分子を意味する。

好ましい駐機において、典型的な免現ベクターは、真核細胞中では複製不能なレトロウイルス免現ベクターである。レトロウイルスの構築と使用法は、ソージ(Sorge) 等により移告されてい

本発明のDNA断片を機能的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの観能的性質及びトランスホームされる宿主細胞などが超換え DNA分子の排及技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに概能的に結合しているDNA断片中に含まれるhuTFh又はプレhuTPh遺伝子の、少なくとも複製を、好ましくは発現をも可能にする。

好ましい酸糠において、本発明により考案されたベクターは、 原核性のレプリコン、すなわち、バクテリア宿主相節のような原 核細胞中の、これをトランスホームした集色体外組備えDNA分 子の自己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。こ のようなレプリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、 原核性レプリコンを含むこれら監御は、これをトランスホームし たバクテリア宿主に選利耐性を与える遺伝子も含んでいる、典型 的なバクテリアの取利耐性遺伝子は、アンピシリン又はテトラサ イクリンに対する耐性を与えるものである。

る(モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(No). Cell. Biol. ) 6 色、1730~87頁(1984年)。

相補的なホモボリマー末端を介して、DNAをベクターに確認的に結合する多くの方法が開発されてきている。例えば、相補的なホモボリマーを、挿入するDNA断片及びベクターDNAに付加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相補的ホモボリマー末端間の水煮結合で結合し、組換えDNA分子を作る。

多種の制限エンドスクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、 CN州ニューへブン、インターナショナル パイオテクノロジー 社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換えDNA分子と等値なRNAも考案して

いる.

#### D.トランスホームした初跑と培養

本発明は、本発明の組織えDNA分子、好をしくは可溶性の h ロTPh又はプレトロTPhを発現できるェDNAでトランス ホームした宿主相助にも関連している。この宿主細胞は、原核性 でも真体性でもよい。パクテリア細胞は、原核信主細胞であるこ とが好をしく、また典型的には、ND州ベセスダ、ベセスダ・リ サーチラボラトリース社から入手できる大陽留DH5株のような、 大陽面の株である。好をしい真体性宿主細胞には、イースト及び 本乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サル又はヒトの総理等 細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニー ス・ハムスターの卵巣(CHO)細胞及びCRL1658として ATCCから入手できるN1Hスイスマウス医細胞がある。

本発明の組換えDNAによる適当な知数宿主のトランスホーメーションは、臭型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、頃核性宿主知識のトランスホーメーションに関しては、コーエン(Cohen) 等のプロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nation Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年);及びマニアチス(Haniatis)等のNY州コールド・スプリング・ハーパー・コールド・スプリングへーパー・ラボラトリー、ラボラトリー・マニュアル、モレキュラー・クローニングを参照せよ。脊椎動動細胞の「DNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスホーメーションに関しては、例えば、ソージ(Sorse)等、モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(Hol. Cell. Biol.)4巻、1730~37頁(1984

バク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、首分爵ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質含有百分の分面が含まれる。例えば、タンパク質の分面に対して知られているゲルは過法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに摂するものが、培養物中にある発現タンパク質の単離に用いることができる。さらに、免疫観和性、免疫吸者やそれに摂するもののような、免疫性学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

F. AuTFA及びプレカuTFAタンパク質組成物と発現重物本発明は、また本発明のrDNAのhuTFA及びプレhuIFAタンパク質発現産物も考案している。好ましい監操において、huTFA及びプレAuTFA発現度物は第1図で示されているように、各々残器1から263及び-32から263に対応するアミノ監残器を有している。その発現タンパク質は、第1図で示されるプレAuTFA及びAuTFAのアミノ監疫器を利の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが設定しい。

別の監操において、可溶型のhuTFh及びプレカロTFhと、可溶性huTFhそして、または可溶性プレhuTFhを含む組成物も考案されている。ここで用いている。可溶性。という言葉は、本来のhuTFh及びプレhuTFh分子の細胞外ドメイン、すなわち、第1回に示すところのフミノ末端から残落220までの、huTFh及びプレhuTFh分子領域を基本的に含むことを特徴とするhuTFh及びプレhuTFh分子を意味する。それゆえ、可溶性huTFh及び可溶性プレhuTFhは、本来の分子で形成されるトランスメンブレン・アンカー領域の実質的部

プレカロTFカ抗原性を示すタンパク賞、またさらに好ましくは、 生物学的に活性なカロTFカを含むことが望ましい。

トランスホームした宿主初胞を培養するのに有用な栄養培地は 当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市 版されている。宿主報胞がよ乳類細胞であるような監様において は、「無血清」培地を使うことが望ましい。

## B. huTFA及びプレトuTFAタンパク質の生度方法

本発明の別の特徴には、huTFh抗原性を示すタンパク質の 生産方法がある。huTFh抗原性を示すタンパク質は天然の組 機因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質で ある。huTFh抗原性を示すタンパク質は、抗原として有用で あり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明 の始断システムや診断法で使用することができる。

年)、グラハム(Grahae)等、ウィロロジー(Pirol.)。52巻、 培養 456頁(1973年):及びウィグラー(Higher)等、プロシ NA分子、好ましくは可溶性の ーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス

(Proc. Kail, Acad. Sci. )USA、76巻、1373~76貝 (1979年) を参照せよ。

うまくトランスホームされた細胞、すなわち、本発明の組換え DNA分子を含む細胞は、従来の方法によって同定することがで きる。例えば、本発明のrDNAの導入から生じた細胞をクロー ン化し、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから 細胞を収穫し、溶解し、そのDNA内容物について、サウザーン (Southers)(ジャーナル・オブ・モレチュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) 98巻、503頁(1975年)又は、ベレント(Borent)等(バイオテクノロジー(Biotech.) 3巻、208

ント(Borent)等(パイオテクノロジー(Bioteck.) 3巻、208 貝(1985年)によって報告されている方法を用いて、その rDNAの存在を偶べた。

rDNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホーメーションは、そのrDNAがAuTFA又はプレAuTFAを発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ペクターでうまくトランスホーメーションできた初散は、AuTFA又はプレAuTPA抗康性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞試料を収穫し、本発明のハイブリドーマによって生産される抗原等に特異的な抗体を用い、AuTFA又はプレAuTPAを検定する。

このように、トランスホームした宿主和職それ自体に加え、本 発明は、栄養培地中のそれらの協随の培養物好をしくは、モノク ローナル (クローン的に均一な) 培養物、又は、モノクローナル 培養物由来の培養物も考案した。この培養物は、カロTPN又は 分(第)図で示すところの残器220から242)を含まない。 ここで用いている。カロTFh。及び、プレカロTFh。という 言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可溶型を 含んでいる。

好さしい可溶性トップドルタンパク質は第1図で示されているところの、アミノ末端の残器的1者から、209番を採由してカルボキシ末端の残器224番で示されるアミノ放残器を示している。従って、好ましい可溶性トップドルタンパク質は第1図で示すところの約1番から約209番、約1番から約219番及び約1番から約224番の残器で表わされるアミノ放残器配列を有するものである。

好さしい可容性プレカロTFカタンパク質は、第1図で示すところの、アミノ末端の一32番から、209番を経由して、カルボキシ末端の224番の残酷で表わされるアミノ放残器を有している。従って、好ましい可容性プレカロTFカタンパク質は、第

下、血管系液状サンプルを尋集する能力を意味する。最無能力を 検定するのに十分な、異型的AuTFAタンパク質確度は、例2 におけるサンプル/AuTFA出と同じ比を用いたとき、約0.1 ps/ssから約100ns/ss、好ましくは、約1ps/ss から約10ps/ss、そしてより好ましくは約10ps/ssから約1ns/ssである。もちろん、磁集能力を検定するときに 必要な速度よりも高い速度であるが、好ましい速度に希釈しうる AuTFA溶液も考慮されている。

好ましい賠担において、AuTFA含有水溶液は、リン脂質又は非イオン性界間活性剤中に分散されたAuTFAを含んでいる。 典型的リン脂質:AuTPAタンパク質重量比は、約5:1から 12000:1、好ましくは、約50:1から約5000:1を してさらに好ましくは、約100:1から2500:1の範囲で ある。

### G.ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には 約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ放残器 を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残器を含んでいる。さ らに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ放残器配列及び新し い機能特性を特徴としている。

従って、本発列のポリペプチドの1つの旅稼は、血液素質因子 V/Vs a への h u TF h の結合を競合的に阻害する能力をその特徴の1部としている、 h u TF h 結合部位ポリペプチド類似物である。 本発明の結合部位類似物は活性化した複合体を作ることなく、すなわち、発展を開始することなく因子V/Vs a に結合することが望ましい。

ここで用いている。独合体。という言葉は、抗原-抗体又は、

1 図で示すところの約-32番から214番、約-32番から 219番、及び約-32番から約224番の残器で要わされる7 ミノは残器区列を有するものである。

1 つの筋棒において、b u T F h 及びプレカ u T F h 発虚物は グリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のx DNA でトランスホームした原体和胸中で生産される。

非グリコシル化型のhuTFh及びプレhuTPhは、本発明の接種物及び診断システムにおける免疫源及び抗原として有用である。

典型的には、真弦和助で生産されたカロTF h 及びプレかのIPh はグリコシル化されており、京た抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、"生物学的活性"という語句は、因子W/Waの依存の最無を誘導する能力をもつカロTF h 又はプレカロTF h タンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子経額タンパク質を含まない生物学的に活性なカェTFAを含有する水溶液を含む組成物を考案している。その組成物も実質的に例えばラウリル酸設ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDSーポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDSーPAGE)で測定される約、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが望ましい。

水溶性のAuTFA合有溶液は血液又はクエン酸化した血漿の ような血液由来の医物のような血管系液状サンブルの凝氢能力を 検定するのに十分な生物学的に活性のあるAuTFAを含んでい る。"凝氢能力"という語句は生物学的に活性なAuTFA存在

レセプターーリオンド反応のような特異的結合反応の度物を意味 している。代表的複合体としては、免疫反応震物及びここでffi MI/MIII と示されているところの組織因子 - 因子MI/MII 結合反 応度物がある。

好をしい触様において、 h u T F h 結合部位類似物は、少なく とも第1回に示されている 3 0 ~ 3 5 季のアミノ酸残器を表わし ている次に示すアミノ酸残器配列:

- VNQVYT-

を含んでいる。

さらに好ましくは、カロTFN結合部位規模物は、少なくとも、 次のアミノ政務器配列:

- VNQ VYT VQ I ST ~ 及び

-LYYWKSSSSGKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30~40及び 155~167等の、カロTFカのアミノ放残器を示している。

さらに一層好ましい場合は、A o T F A 結合部位類但物は第1 図で示すところの、各々 2 6~4 9 香及び 1 4 6~ 1 6 7 香で汲 わされている、次のアミノ放残器配列;

- EPKPYNOVYTVOISTKSEDHKSKC - .

- VFGEDLITTLYYWKSSSSGERT - .

からなる群から選ばれたアミノ放張基配列を含む。

好ましいトロアドト結合部位ポリペプチド類似物は第1支で示されているアミノ政務首配列を含んでいる。

第 1 表

名 称。

アミノ放然番配列

a. 各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ 数殊器配列を表わしている。

ポリペプチドp 26~49、p 1 46~167及びp 161~189も、抗ねロTF h抗体分子がねロTF hに結合するのを中和 (競争的国客) する能力を特徴としている。抗ねロTF h抗体のねロTP hへの結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2素に示されているものである。

第 2 表 -

名称

アミノ放残基配列

a. 実験名に付けられた。C。は、タンパク質結合のためのリンカーとして、示されている配列に付け加えられたシスティ

れる。リンキングに使われる典型的アミノ酸残落は、チロシン、システィン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに 頭するものである。さらに、本発明のポリペアチドは、末端別。 森アシル化、別えばアセチレーション又はチオグリコン酸アミデーション、ターミナルカルボキシアミデーション、例えば、アン モニア、メチルアミン、その他により配列が修飾を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリャー・ハブテンのように、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリヤーとの結合の場合、本発明のポリペブチドは、カロTF Nと免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみて、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペブチドの抗原的に関連したパリアントも考案している。 \* 抗原的に関連したパリアント・とは、第1要もしくは第2表のポリペプチドの、少なくとも6個のアミノ酸残器配列領域を含み、かつ、第1表又は第2表のポリペプチド及びカロTF Nと免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、 h u T P h 結合部位ポリペプチド類似物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考案している。 典型的なリン脂質:ポリペプチド重量比は、約5:1から200:1、好ましくは約30:1~80:1、さらに好ましくは、約45:1~55:1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに適している好ましい h u T P h 結合部位類似物をセクションII の第4表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分解ではよく知られているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多くの技術のすぐれたまとめは、J. N. スチワード(Steward )及び

ン残基を示している。

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子リグリョへの結合に対し、本来の組織因子と競合でき、そして、または、 カロTFAに対する抗AuTFA抗体分子の結合を競合的に囲客 しうるかぎり、AuTFAのアミノ酸残器配列と同一である必要 がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使 用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず挿 入、欠失及び関連のような強々の変化を与えることができる。

保存的置換には、あるアミノ酸残器が他の生物学的に同様の残器に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンのような確水的残器間の置換又は、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミンとアスパラギン及びそれに類するもののような複性残器間の置換がある。また。保存的置換。という語句には、もし、ポリペプチドが、必要とされる結合活性を示すならば、未置換の元々のアミノ酸の代りに、置換されたアミノ酸を置いることも含まれる

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的 関接をしているために、本来のhuTFhの配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は関係マトリックス、又はキャリヤーにうまく固定する。リンカー。を提供する目的で、その各末端に付加的残益をつけ加える場合は別にして、アミノ政 残益の適常せいぜい約20パーセント、より普通には、せいぜい 10%が置換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリヤーは以下に述べる。

通常、アミノ酸残萎リンカーは、少なくとも1残器であり、また40以上の残器のこともあり、しばしば1~10残器が用いら

J. D. ヤング (Young ) の\* 固格ペプチド合成\* (1969年、サンフランシスコ、H. B. フリーマン (Freeman ) 社) 及びJ. メイエンホーファー (Melephofer) の\* ホルモン性タンパク質及びペプチド\* (1983年、アカデミックプレス社 (ニューローク)、2巻、46頁) が固相ペプチド合成について、またE.シュローダー (Schroder) とK.クブケ (Mubke ) の\*ペプチド\* (1965年、アカデミックプレス社 (ニューローク) 1巻) が

(1905年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク) 1 を) が 古典的な液相法について行なわれている。

### B. 接種物

別の脂様において、本発明のポリペプチド又は、その抗康的に 関連したパリアントは、生理学的に許容しうる水性布教剤組成物 として、その効果的量が投与された時、huTFhと免疫反応する抗体を誘導することができる接種物となる。 橋々の文法型の ・接種物 \* という語は、huTFhに対する抗体の與裂に用いられる活性成分として、本発明のポリペプチドを含む組成物とし用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体としてキャリヤーと結合して、又は、ポリペプチド重合体として用いられるのであるが、表現の想便性のため、本発明のポリペプチドの種々の症機は、全て、「ポリペプチド・という語及びその種々の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約3.5以下のアミノ放張基を含むポリペプチドに対し、すでに 記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリャーに結 合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1つ以上の付加的アミノ改改さなポリペプチドのキャリヤーへの結合を励けるため、そのポリペプチ ドのアミノ又はカルポキシ末端に付加することができる。ポリペ

### 待表平1-503438 (13)

プチドのアミノ又はカルボキシ末端へ付加したシスティン残るは、ジスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調製の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応運物、グルタルアルデヒドのようなジアルデヒド(クリプスタイン(Klipateia )等(ジャーナル・オブ・インフェクシャス・デシーズ(J. Inpect. Die)、147巻、318~326頁、(1983年))及びそれに鎖するものの使用、又は、キャリヤーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボジィミドの使用ような、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能器を介して

ーに対し、ナミド結合を生ずる、水溶性カルボジイミドの使用ような、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能否を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス (Aureneas) 等のスカンジナピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Scand. J. Insunol.) 8 巻、補1、7、7~23頁(1978年)を参照せよ。

有用なキャリヤーは、当分野ではよく知られておう、一般的にはタンパク質そのものである。そのようなキャリヤーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン(KLH)、エデスチン、チログロビン、子ウシ血清アルブミン(BSA)やヒト血清アルブミン(HSA)のようなアルブミン類、ヤギホ血球(SRBC)のような赤血球類、テタナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ(Dーリジン・Dーグルタミン酸)のようなポリアミノ改及びこれに鎖するものがある。

キャリヤーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存しており、本発明に特に関係しない基準に基づいている。例えば、接種される動物中で不都合な反応を起こさないキャリヤーが選択されるべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリヤーに結合した結合物

びイエノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はパラトーブを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイエノグロブリン分子、真質的に本来のものと同じイエノグロブリン分子及びFab、Pab'、F (ab')。及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、パラトープを含有する、イエノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、b u T F h 及び本発明の特異的ポリペプチドの少なくとも1 つと免疫反応を起こす技体分子を含むことを特徴とする抗ペプチド抗体である。

例えば、カロTFA及び組織因子結合部位のポリペプチド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の技体組成物は組織因子が因子リノリッと結合する能力を中和できる。従って、好ましい抗体組成物は、カロTPA及びp26-49又はp146 でしてい抗体組成のは、カロTPA及びp26-49又はp14 の で しん で しん で かっ、p204~226 と 免疫反応する なんを含む しっ ナル抗血液は、p204~226 と免疫反応する技体を含むことに注意すべきである。このように、抗204-226免疫反応性が実質的にないことが、本抗体組成物と従来の得合されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生産は、水乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有する水乳類抗体分子を誘導することによって行なわれる。さらに、その抗体分子を表のよ乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような健康技術によって、その必要量を単離する。このように生産した抗体組成物は、なかんずく、診断法及び身体サンブルにおけるトロTFトを検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

として、効果的な免疫原量の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当りの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物種、その動物の体置及び選択した接種レジメンに依存する。典型的に、接種物は、接種(役与)当り約10マイクログラムから約50ミリグラムのポリペプチドを含んている。

本発明の接植物に用いられている。単位投与。という目句は、各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリヤー又はピヒクルと共に望ましい免疫原的効果を遅むのに必要な予め決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に通した物理的に分離した単位を忽映する。本発明の接植物の新しい単位投与に関する明和は、40活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学的効果、及び40ここで詳細に公開されている動物中での免疫学的使用に内在する制限により説明され、かつ直接依存しており、これらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸酸衝食塩水など の生理学的に許容された(受容できる)希釈剤中にポリペプチド ・結合体を分散させることにより、乾燥した固体のポリペプチド 結合体から水性組成物を調賞することができる。

また、接種物は希釈剤の一部として、アジュパントを含んでいる。完全フロイントアジュパント (CFA) 、不完全フロイントアジュパント (1FA) 及びミョウパンのようなアジュパントは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されている。

#### 1. 抗体及び抗体組成物

植々の文法型の"抗体"という語は、イムノグロブリン分子及

モノクローナル抗体組成物も、本発明で含まされている。検出 限界内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的に h u T F h を 結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を含んでいる。従って、奥 型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それが h u T F h 以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ含んでいたとしても、 h u T F h への結合親和性を示す。ひとつの監禁において、モノ クローナル抗体組成物は、 h u T F h 及び、組織因子結合部位の ポリペプチド類似物、好ましくは p 2 6 ~ 4 9 又は p 1 4 6 ~ 1 6 7 と免疫反応する抗体分子を含んでいる。

他の監視において、本発明は、AuTFAと免疫反応し、 AuTFAにより開始する磁集を選客する抗体分子を含む抗毒無 (中和) MoAbを考案した。さらに最級を顕著する好ましい MoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、AuTFA結合部 位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示され ているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の監視において、抗弱無 MoAbは、huTFh及びhuTFh: 因子リンリョの複合体と免疫反応し、huTFhによって開始する破無を阻害 (中和) する抗体分子を含んでいる。さらに、好ましい抗凝無 MoAbは huTFhポリペプチドp1-30又はp26-49と免疫反応することを特徴とし、またこれは、huTFhポリペプチドp56-71と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組織因子の最無を開始する能力を中和しない 気体分子を含む非中和性モノクローナル抗体組成物も考案した。 モのような組成物は、 A ロ T F B 及びポリペプチド p 1 - 3 0 と 免疫反応し、かつ、ハイブリドーマ T F 9 - 1 0 H 1 0 により生 産 (分泌) される抗体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド特

異性をもつ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培 地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始すること によって生産することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分泌するのに 十分な条件及び時間、培養を維持する。それから、抗体含有培地 を収集する。さらにこの抗体分子を従来法により単脳する。

これらの超成物の調要に有用な培地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されていて、合成培養培地、阿血統業強マウス及びそれに領するものが含まれている。代表的合成培地は、4.5 g/2のグルコース、20 mグルタミン及び20 Mウン胎児血清を補足した、ダルベコ最小培地(DMEM:ダルベコ(Dolbecco)等、ヴィロロジー(Vivol)、8色、396頁(1959年))である。代表的同血繁殖マウス株はBalb/eである。上述の方法で生理したモノクローナル抗体組成物は、例えば、AuTFh含有免疫反応の形成が必要である、診断及び治療法で用いることができる。

#### J. ハイブリドーマ

本発明のハイブリドーマは、huTFhと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴とする。さらに、好ましいハイブリドーマは、huTFhで開始する高無を阻害し、また、望ましくは、本発明のポリペプチド、好ましくは、huTFh結合部位ポリペプチド度収物、そしてさらに好ましくは、第1 表に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴としている。さらに好ましい監機においては、抗發集Mo入bは、非ヒト、望長環、T1 と免疫反応する。

他の好ましい態様において、本発明のハイブリドーマはhaifh 及びカロTPh:因子な/ti a の複合体と免疫反応し、hoTFh

Wa複合体形成速度の波少によると考えられている。従って、生体内において、huTFh因子W/Wa結合部位ポリペプチド類像物の投与は、暴氣やある炎症反応のような、組織因子の因子W/Waへの結合により開始する生理学的応答を問題するのに用いることができる。好ましい腹横において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン騒賞中に分散して投与される。

生体内における組織因子による因子リノリョの結合を調節する他の方法は、本発明の抗体組成物(抗ペプチド抗体)又は抗凝集MoAbの効果量を静脈は耐により投与することである。この抗体分子は、パラトピック制度を含み、かつイムノグロブリン分所片F(ab')。、Fab及びそれに関するもののような、Fc 領域を含まないものである。治療的に効果的量の抗凝集MoAbは、体験は当り15mgから5m、好ましくは体質は当り、約100ggから約1mc、より好ましくは、体重は当り約150ggから約500ggの範囲である。

他の脱機において、本発明のMoAb、抗發無MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗腫瘍は薬に結合し、抗腫瘍治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗腫瘍治療組成物を、その液面に組織因子を発現する腱瘍相関を有する被検者に投与することができる。このような腫瘍相関の代表例は、胸及び肺のがん細胞である。

ここで考案された抗謀痛は深の代表例には「3・1、「1・Re、2・1 Bl 及びこれに残するもののような放射性核種がある。放射性核種結合モノクローナル抗体治課組成物の製造法及びその使用法は、コザック(Kozak )等(トレンズ・イン・パイオテクノロジー(Treads in Biotech.) 4 巻、253~264頁(1986年))により報告されている。 により関始する超無を中和する抗体分子を生産する。さらに、 カロTP h: 因子リンは a の複合体と免疫反応するハイブリドー マ生産抗体は、数抗体の、カロTF h ポリペプチドゥ1-30又 はp26-49、好ましくはその両方と免疫反応し、かつ、より 好ましくは、技抗体分子が、ポリカロTF h ポリペプチドゥ56 -71とは免疫反応を超こさないことを特徴としている。

望ましい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク實をして、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生理する (分泌する) ハイブリドーマの作成注は、自分野ではよく知られている。特に、ニマン (Niman ) 等により報告されたハイブリドーマ技術は (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Pvoc. Fetl. Acad. Sci.) USA、80巻、4949~4953頁 (1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例13の第5度に示した。

ハイブリドーマ培養物TP8-509、TP9-6B4及びTP9-10H10はブタベスト協定に従がい、1987年3月27日ATCCに保管され、各々受理書号、HB9382、HB9381及びHB9383が割当てられた。

#### 1. 治療方法及び組成物

本発明のAuTFA因子をノリュの結合部位ポリペプチド類似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝集MaAbは各々、生体内において、組織因子による因子をノリュの結合を調整するのに用いることができる。

別えば、huTFh因子項/項』の結合部位ポリペプチド類似物は、効果量を被換者に投与したとき、因子項/項』の組織因子への結合を競争的に限審することができる、医療的に許容しうる組成物に用いることができる。この限客は、組織因子-因子項/

投与されたポリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又は サスペンジョンの形をしているが、ポリペプチドは、錠剤、丸壌、 カプセル、放出持続製剤又は初末の形もとる。どの場合にも、こ の組成物は、0.10 メ~95 米、好ましくは、25 %~70 %の 活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は抗体分子を含む治規組成物の 観製は、この分野ではよく知られている。典型的には、この分野ではよく知られている。典型的には、 な組成物は、液体溶液又はサスペンジョンのような注射可能な形 に調製されるが、注射的の液体溶液又はサスペンジョンを作るの に調製されるが、注射的の液体溶液又はサスペンジョンを作るの に調製されるが、注射的の液体溶液又はサスペンジョンとで であるとしても調製される。またこの調製物はエマルジョン化されることもある。この活性治療成分は、しばしまる。 がませたされることもある。この活性治療のは、 医葉的に許容でき、かつ、活性成分に適合する 医形別と混合する。 例えば、典型的底形別としては、水、食塩水、デキストロール、 がリセロール、エタノール又はそれらに類するもの及びこれを がリセロール、エタノールフはそれらに類するものな は、加湿利又はエマルジョン化別、 の効果を促進する補助物質を少量含ませることも可能である。

ポリペプチド又に抗体分子組成物は、中和した医療的に受容し うる塩の形に調整することもできる。医療的に受容しうる塩には、 設付加塩(ポリペプチド又は抗体分子の遊離しているアミノ 著で 形成される)及び、例えば、塩酸又はリン酸のような熱機酸又は、 計酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれら に緩するもので形成されるものがある。遠離したカルポキシル為 で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム カルシウム又は鉄の水酸化物のような無関塩基及びイソプロビル アミン、ドリノチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒス チジン、プロカイン及びこれらに類するもののような有機性高か ら捻逐される。

治療用のポリペプチド又は抗体分子含有組成物は例えば、単位 技与量の注射によるように、局所的に又は静脈性射により簡便に 拉与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる。単位役与。という語句は、ヒトに1回役与するのに適した、必要とされる名歌列、すなわち、キャリヤー又はビヒクルと共に、望ましい治療効果をあげるために計算された、予め決められた量の活性物質を含む、物理的に分離されている単位を意味する。

按級成物は、投与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は処置される検体、活性成分を利用する検体の血液凝集システムの容量及び望ましい組織因子結合能の関寄又は中和度に検存する。投与される必要のある活性成分の特密な量は、医師のは断に依存し、かつ、各個人によっても異なる。しかし、適当なポリペプチド投与範囲は、1日に、是者当り、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、投与の経緯に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計画もあるが、典型的には、一次投与後、1時間以上の間隔をおいて、さらに注射では他の方法による投与が扱う返えされている。以上、血液中、10ナノモル減度から10マイクロモル速度を維持するのに十分な、持续的静脈注入性も考案されている。

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に 十分な量の、分包は乗として、本発明の発現タンパク質求リペプ チド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。

また、この分包試現の使用説明書も含まれているのが普遍である。 典型的に、"使用説明書"には、試頭議院には、混合する試発

・イムノロジー (Scand. J. Japopool.) 8 巻、補版7巻、7~23 頁(1978年)、ロッドウェル (Rodwell) 9 切、パイオテク ノロジー (Blotech.) 、3 巻、B 8 9~8 9 4 頁(1984年) 及び未国特許第 4.493,795号参照。

また、診断システムは、好ましくは分包の、特異的は斑を含む。 \*特異的結合は斑"は、本発明のは斑を選択的に結合できる分子 であるが、本発明のタンパク質発現度物、ポリペプチド又は抗体 分子やのものではない。代表的な特異的結合は斑は、抗体分子、 循体タンパク質又はその断片、タンパク質人、血液凝集因子は/ 切1、子クシ組織因子及びそれに関するものがある。この特異的 結合状況は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと 結合することが望ましい。

好ましい 監視において、特異的結合試取はラベル化される。しかし、そのは新システムが、ラベル化されていない特異的結合試 策を含むとき、典型的には、この試策は、増中手段又は試策として用いられる。これらの監視において、このラベル化した特異的 結合試策は、この増中手段が、反応程合有複合体に結合している とき、この増中手段に特異的に結合することができる。

本発明の学師キットは、血清、血法又は尿のような体液サンプル中のトゥTFトの存在又は量を検出するのに。イライザ・方式で用いることができる。。イライザ性。は、サンブル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素一抗原又は酵素一抗体結合物を用いた、酵素結合免疫吸着検定性のことである。イライザ性の段明は、全て参考としてここに組込まれている、1982年、CA州ロサンゼェルスのラング・メディカル・ペブリケーションから出版された、D.F. サイツ (Sites ) 等の基本的及び臨床的免疫学、第4編、

とサンブルの相対量、試策/サンブル混合物の維持時間、温度、パッファ条件及びそれに減するもののような、少なくとも1回の 独定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい賠償において、さらに、本発明の診断システムは、は 資を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでい よ。

ここで用いられているように、種々の文法型の。ラベル。及び "指示手段"は、複合体の存在を示す検出可能な信号を重みます。 のに直接又は間接的に関連する単一の原子及び分子を意味する。。 "全体内"ラベル又は指示手段とは、被検者の体内で有用なものである。どのラベル又は指示手段とは、本発別の抗体をインクローナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、又はポリペプチドに結合又は退込まれていることもあるし、また別々に使用されることもあり、または、配案的診断化学においては、よく知られているものであり、 とともに使用されるときに関り、本発明の一部を持成する。

うべルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のうべれ化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生産される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性同位元素含有アミノ政の代別的取込みによるうべル化が可能である。例えば、ガルフレ(Galire)等の、メンッズ・イン・エンザイモロジー(heth. Enzyool.)73巻、3~46頁(1981年))参照、活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス(Auranesse)等の、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい監機において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この公断システム中に、分包されている固体サポートを形作ってい

典型的に、このは策の固体マトリックスの固定は、他の固定法 もあるが、この分野でよく知られている水性媒体からの吸帯が用 いられている。

有用な箇体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社(NJ州、ピスカタウェイ)から、セファデックスという登録関係で市販されている、気機デキストラン;アガロース;1 L州、北ウカゴ、アボット・ラボラトリーズ社から市販されている直径的1 ミクロンへ約5 ミリメートルのポリステレンピーズ;シート状、ヒモ状又はへう状のポリ塩化ビニルポリステレン、燥槽ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの締物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、プレート又はマイクロブレートのウェルが含まれる。

ここで述べられているは断システムのは策、ラベル化結合は現 又は、増市は策は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、 凍結乾燥型のような、実質的に就風粉として提供される。指示手 段が酵素である場合、この酵素菌質も、システムの別の包むに提 供される。先に述べた、マイクロブレートのような固体サポート 及び1つ以上のパッファも、この診断検定システム中に別にパッ ケージされた要素として含まれている。

一拳斯システムに関連して、ここで錯論されているパッケージは、

診断システムにおいて通常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラスチック型の(併えば、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリカーポネート)ポトル、パイアル、プラスチック及びプラステックホイルでラミネートした外姿物及びこれらに類するものが含まれている。

#### 8. 检定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている、発現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することにより h ロ T F h を検出する方法を考案した。 当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている 配床的 社 版の化学手段があることが理解できよう。 徒って、奥型的技定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

#### 1. 血技技出

被検者中に存在する血栓検出法が考案された。生体内での指示手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射する。好ましい旋機において、ラベル化した抗体は、 h u T F h 及び第1 支及び第2 支のポリペプチドと免疫反応するが p 2 0 4 ~ 2 2 5 とは反応しないもので、好ましくはハイブリドーマT F 8 ~ 5 G 9、T F 9 ~ 6 B 4 又はTF 9 ~ 1 0 B 1 0 から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血性の一部に存在するカロTFAと反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一場されるのに十分な付加的時間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。

2.身体サンプル中のカロTFhの検出

### ートした。

その後、残留脳組織固体を各々、その固体をヘプタン:プタノール (2:1) 25ミリリットル (al) 当り、組織固体1gの割で、ヘプタン:プタノール (2:1) と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで減退により、その固体を回収する。最後の減退後、残留脳組織固体を再び大気圧下、約20で一晩で乾燥し、脱脂脳組織粉末を作り、必要になるまで、-80でに保存する。

つづいて、福組機粉末25グラムをTS/EDTAパッファ (100ミリモル譲渡(mM) NaC&、50mMトリス・塩酸(せ7.5)、0.02%Tジ化ナトリウム、5mMエチレンジアミン四 跡酸(EDTA)、0.1%(V/V)トリトンX-100(ボリアリルエチレン-9ーオクチルフェニルエーチル))500mをと混合し、ついで4でで一晩撹拌する。さらにこの混合物を15.300×gで1時間違心する。生じたベレットを500mをのパッファA(100mMac&、50mMトリス・塩酸(pB7.5)、0.02%Tジ化ナトリウム、2%トリトンX-100)に再懸濁し、スラリーを作る。室温で1時間の撹拌後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上滑を回収し、液結乾燥した後、100m&のパッファAに溶かして、huTFh含有福抽出熔液を作る。

### 2. huTFの凝血活性を測定するための蒸集検定法

A B T F プロコアグラント活性を、37 T に 複辞した、全域類及び混合物を用いて行う、1 段階 森 集技定法で規定した。 血禁と同等機の、20mMクエン酸ナトリウム2水和物及び140mM MaC & (p87.4) を含む溶液を混合することにより、正常なヒト血液をクエン酸化した。 TBS/BSA溶液 (150mM Mac & 、

身体サンプル、好変しくは体液サンプル中のhuTFhの存在、及び好変しくはその量を検出するため、競合的又は非競合的な、観々の不均一及び均一検定性が利用できる。例えば、液体体級サンプルと、ラベル化したp26-49を、マイクロプレートのウェルの内壁に固定した、ハイブリドーマTF8-5G9又はTP3-10H10から生産された抗体分子を含む固体サポートと混合し、固被相免疫反応混合物を作る。この混合物をサンプル中に存在するhuTFh及びラベル化したp26-49が、固体免渉ートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固相免疫反応とで発力を形成するのに十分な時間、生物学の検定条件下に維持する。未結合のラベル化p26-49を投反応直動から取り除く。その後、免疫反応度物として結合したラベル化p26-49の量を開定し、その差により、huTFhの存在を検定できる。

次に示す例は、本発明の説明を意図したもので、これを製造するものではない。

#### 1.組織因子合有ヒト脳抽出物の開製

生検で得られた正常なヒトの話を12時間以内に処理するかもしくは、-80でに保存する。その強限及び大福を除き、ついて 没存する福部分を、ポリトロンホモジナイデー(NY、ウェスト バリー、ブリンクマン、インスンラメント社)を用いて、等容量 の冷(0で) アセトン中でホモジネートした。このホモジネート したものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その退降関係を 分を、焼詰ガラスロートを用いて逃遇して回収した。各々7回の 2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづく放過により、残智固 体からアセトン可将性物質を抽出した。最後の越過の後、残存するアセトンを、20で、一晩、残留関体から大気圧下でエバボレ

50mMトリス・8C & (pB 1.5)、0.1%子ウシ血管アルブミン)で希釈したhuTFを含むサンアル100マイクロリットルを、100μ&のクエン酸化血漿と混合した。25mMCoC & , 榕板100μ&を混合し、凝集反応混合物を作り、凝集が始まるまでゆっくりと揺らした。CaC & 。 添加と、森血形成の間の時間を測定した。それから、huTF活性の標準曲調を、砂で示した凝集時間と希釈率をプロットすることにより作った。代表的模準曲線を第3回に示した。

### 3. huTFの観和性単離のための、因子Vic含有固体サポートの 個類

ヒトの因子は/Via を参考文献として組込まれている、フェア(Fair)の報告(ブラッド(B)ood)、62巻、784~91頁(1983年))に従って早難した。この単難した因子Viviaを、アガロース固体マトリックスに結合するため、4でで一晩、その5ミリグラム(ag)を、0.1M2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)(pH6.5)に対して透析した。塩化カルシウムを最終復度1mMとなるように添加した。キれから因子Viviaを4m2のアファゲルー15 活性化アガロースピーズ(CA州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社)と流合し、生じた結合反応遺合物を、製造業者が接触するもの(バイオラド)に従って4で、4時間の回転処理を行った。

図体サポート上の週剰タンパク質結合部位を、その関体サポートを、0.1 Mグリシンエチルエステル中、蜜議で1時間復讐することにより、ブロックした。その後、この図体サポートを、焼結ガラスロート上各約20mlの0lパッファA、Ø1MNaCl合有パッファA、Ø5mMEDTA含有パッファA及び401mMCaCl。含有パッファAをこの域序で用いて洗浄した。それか

ら通刺の液体を城圧下で除き、半乾燥状の粒子物質(ケーキ)を ・作った。

#### 4. h v T F の因子は/VI 気和性による単離

0.1 Mのグリシンエチルエステル及び0.1 M MES(pH6.5) を含む20m2の移液を、225m2のアフィゲルー15アガロースピーズ (バイオラド) と混合し、結合反応混合物を作る。この結合反応混合物を窒温に1時間維持する。この生成した結合物を、焼結ガラスロート上、10倍容のバッファ1を用い、波圧下では過することにより洗浄し、グリンンエチルエステルーアガロースケーキを作る。

例1で調製した30mをの協論出溶液を、1mM塩化カルシウムを含む6リットルのパッファAに対し、4で、1残透析を行う。 透析した協論出物を、グリシンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固被相反応混合物を作る。回転しながら変温で2時間維持した後、この固減相を規格ガラスロートを用いて減過することで分離する。この液相を回収し、最終温度mを当り10ユニットとなるようにトラシロール(MO州、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチニン)と混合する。この回収した液相を例3で調製した因子吸/Na/アガロースケーキと混合し、第2の固/液相混合物を作る。

この複合物を回転しながら、一晩4℃に維持し、huTF-因子でプロョ合有固相度物を形成させる。その後、この固相及び液相を先に述べたように疎通により分離する。焼結ガラスロート上に残留物する固相を1mM塩化カルシウムを含むパッファA25m4で洗浄した。さらに、この固相を挽結ガラスクロマトグラフィーカラム(0.5×15cm、パイオラド)に移し、6m4の同洗浄パッファで洗浄した。上記の洗浄後、この固体サポートに結合

したトゥTPを、焼結ガラスカラム上に保持されている固体サポートを5mMのEDTAを含むパッファAで洗浄することにより、波隠 (溶出) させる。溶出した物質を1mを面分づつ回収し、各国分について、例2で述べた方法により、トゥTPの存者を検定した。トゥTF含有面分を無め、4でで、1メトリトンX-100を含む6リットルのTBS(150mM NoCa、150mMトリス塩酸、pH7.5)に対して1酸透析した。

このようにして作った透析物をつづいて、4倍容の冷アセトンと複合し、huTFタンパク質を沈散した。この沈殿をおよモー10で、5000×8、30分間の遠心で集めた。生皮したペレットを資素雰囲気下で乾燥した。典型的な収量は、脱騰した脳観機物末1グラム(乾燥重量) 当り、2月8のhuTFであった。

このようにして生じた単離トロTドサンプルをTBS/トリトン中に起漏し、ついで、製造類者の指示に提がい(1 L、ロックフォード、ピアス・ケミカル社)、ヨードゲンを用い、Na \*\*\*1でラベル化した(1 L州、アーリントンハイツ、アマーシャム社、マイクログラム当り16マイクロキューリ)。ラベル化法、透射の未反応\*\*\*1をTBS/トリトンを用いたセファデックスG25(NJ. ピスカタウィイ、ファルマシア社)での設塩クロマトグラフィーにより、ラベル化した h u T F から分離した。

\*\*\*\* 1 ラベル化 h u T F 含有サンプルのラウリル破散ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動による (SDS-PAGE) 評価は、レムリ (Laesali) (オイチャー (Fature)、227巻、680~685頁(1970年)) の方法に従った。違元条件下で評価するサンプルに対しては、100mMのジチオスレイトールを、サンプルバッファ中に含有させた。1%トリトンX-100、50mMトリス塩酸 (pH 7.4)、150mM NaC 4中の1\*\*\* 1

AロTFを、10分の1容のTF8-5G9又はPAb100 (ATCC-TIB115:ここで本がティブコントロールとし で用いられているSV40ラージT抗頭特異的抗体を生産するハイブリドーマ)ハイブリドーマ培養上滑とともに、4でで1晩インキュペートすることにより免疫は股化を行った。アガロースピーズ (MO州、セントルイス、シグマ・ケミカル社)上に固定したヤギの抗マウス1をGを、その 第1次免疫反応連制を吸収するのに用いた。このビーズを同バッファでよく洗浄し、結合した

1881-huTFを、DTT存在下又は非存在下、同バッファ中で5分間煮沸することにより溶出した。SDS~PAGE機、タンパク質パンドはオートフルオログラフィーで可提化した。

単離した A u TFを放射性 B り 気化し、D T T で 運元し、ついて 1 0 % T ク リルアミドゲルで S D S ー P A G E 分析したとき、4 7 k ダルトンの見かけの分子量をもつ単一のメインパンドが観察された(第 4 図)。しかし、未運元の h u T F を同様に分析した場合は、およそ 5 8 及び 4 7 k D a の 2 つのパンドが相対的に等しい量で観察され(第 5 図レーン B)、このことは、少なくとも 2 つの異なる多きさのものの存在を示している。

非運元で観察されるこの2つのベンドに対する説明としては、 その大きな方、すなわち、泳動が遅いベンドは、非常に多くのグ リコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けてい ないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィ ド結合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないと いうものである。還元後の単一ベンドの存在は、はじめの2つの 示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいよう に思えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチ ド質は、色素の場所又はその付近に泳動するような十分小さい

のらしく、運元後、10%アクリルアミドでは分離されないので あろう。15%のポリアクリルアミドゲルの還元及び非還元belF の電気味動は、単一の分離した軽額を示すのには失敗したが、い くつかの少貴の、遠く泳動するパンドが観察された(第5図、レ ーンA及びB)。これらの小さい、少量のポリペプチドは、以前 に報告されているように(ブローズ (Broze)) 等、ジャーナル・ オブ・パイオロジカル・ケミストリー( J. Biol. Ches.) 、250 . 巻:10817~20貝(1985年)及びグハ(Guña) 等、プ ロシーディング・イン・ナショナル・アカヂミー・オブ・サイエ ンス (Proc. Ratl. Acad. Sci.) USA、83巻、299~302 頁(1986年))、汚換物を示している。この可能性を明らか にするため、 6 7 k D s 及び 5 8 k D s のパンドは非道元ゲルか ら切り出され、その各々を、ジテオスレイトールで運元し、その 各ャを、15%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに かけた(第5回、レーンC及びD)。 5 8 kDタンパク質は 1 25 kD妊娠及び47kDs 重額であると分った。47kDs のタンパ ク質を分析したとき、同分子量の重額のみが観察された。このよ うに、両者は、SDS-PAGEで同様の学齢をもつ重値を保有 していた。

直接軽額の存在を示すため、\*\*\*1-huTPを、huTP特異的モノクローナル抗体TP8-5C9で免疫性酸化し、それを選元剤存在下の電気泳動にかけた。主要な 4 7 kDe パンドがおよそ、125kDa の分離したパンドとともに観察された(第6回、レーンA)。 遠元化しないサンプルの電気泳動でおよそ 4 7kDa 及び58kDe のパンドを生じたが、低い分子量のポリペプチドは生じなかった(第6回、レーンB)。また非違元huTPの電気泳動は、ブローズ (Broze)等(ジャーナル・オブ・パイオ

ロジカル・ケミストリー( J. Biol. Chem.) 、 2 6 0 巻: 10917 ~ 2 0頁 (1985年) ) により示唆されている h u T F 重復のダイマーと一致する、少量の 9 0 k Da タンパク質も示した。

h u T F 軽額が重額からタンパク質の分解によって生ずるという可能性を研究するため、S D S ~ P A G E により単難した経額及び重額を、N来端アミノ数配列分析にかけた。

重額及び軽額をSDS-PAGEで分階し、アパーソールド (Abersold)等の高pH法(ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Ches.)、261巻、4225~4238 頁(1986年))を用い、活性化した、アミノ被度ファイパーガラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質パンドを、蛍光染料(アパーソールド(Abersold)等、上紀)により、このプロットを可視化し、切り出し、そして、まだファイパーガラスに結合したまま、PTH器率体のオン・ラインHPLC分析を用いたアプライド・パイオシステムズ470人タンパク質シークエンサーで配列決定した。別にタンパク質パンドをコマージ・ブルーによる染色によりゲルを可視化し、シークエンシングのために、電気浄出した。両方法とも等しい結果を与えた。

トロ丁F重貨のマイクロシークエンシングは、ほぼ等モル量のアミノ酸配列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ酸残益は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さがN未満で2残益異なるトロ丁F貫領の2つのパリアントかねじれたN来端をもつことの明白な証拠である。大きい方のパリアントのN未婚は、非特定のアミノ酸Xを含む

Ser-Gly-X-X-Ass-Thr-Val-Als-Als-Tyr-X-Leu-Thr-Trp-Lys-ser であることが設置された。

軽額の比列決定するいくつかの試みは、プロックされたN末端

と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、hellの重額及び軽額は、単層されたhuTFに対して生じた、2つのウサギの抗huTF抗血清及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全てが、重額のみに結合することが分っていることから、抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽額は、重額のタンパク質分解的片とは考えにくい。さらに軽額は、ベーター。ミクログロブリンに対する抗血清とは反応しなかった。

現在、12.5kDのかっ丁F軽額の意味は知られていない。それは、単一の、独立した分子組なので、ランダムなジスルフィド交換による、単型の団にアーティファクトとして誘導されたものでもないようだ。遠元なしに、疑和性による単型を行ったかって下をSDSーPAGEにかけたとき、カュ丁F活性は、5.8kDoと47kDoの分子量に対応するゲルから溶出した。これら2つの分子量に対応するカュ丁F活性も、増脳又は部分的に単型した胎型の抽出物を、SDSゲルの電気泳動にかけたとき(データ示さず)も検出された。全ての場合において、その活性は、因子吸收存で、このことは、カュ丁F特異的活性を示している。これらの知見は、カュ丁Fのみが因子吸を活性化でき、かつ、経貨はこの機能に必要ないことを示している。

軽額がAuTF重額のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは異味深い。生体内で、AuTPの重要な領域に不在なのか、存在するのかとは別に、界面活性別で分解される、非共有的相互作用を介して全合しているのであろう。軽額は、サイズが小さく、SDSーPAGEの際にマーカー色無の部分に除動してしまうため、また、AuTPの報告されている分析例が違元後行なわれていることから、初期の研究では気づかれなかった。現行の観和性を用いた方法で単離することができる制限された量では、

タンパク質染色によって、会合した小ポリペプチド級を検出する ことは困難である。

イン・ビトロでは、単量体トロTFが凝集を開始するにもかかわらず、トロTFによる凝集の生理的防防は、細胞表面で起こる。 軽額は、直接的凝集検定性で検出することができる、トロTF機 能又は機構において重要な役割をはたしていることが推棄できる であろう。例えば、軽額は、因子は/ほsの組織因子への結合の 正の協同性を説明すると仮定されてきている、因子以に対する 2 つのサブユニットレセブターのアッセンブリーに関与している可 能性がある。別に、細胞表面上の構造ドメインでのトロTFの機 構及び、細胞表面上でのトロTF活性の制御は、トロTF軽額に 仲介されるのかもしれない。

N結合オリゴ號の役割は、'\*\* I ー A u T P サンブルの脱ゲルコシル化により試験した。低分およそ3.6×10° カウントを含む、ラベル化 B u T P 約1274ナノグラムを0.4ユニットのグリコペプチグーゼ F (I N 州、インディアナポリス、ベーリンガー、マンハイム・パイオケミカルス社)、20mM J リス塩酸(ρ H 7.5)、10mM E D T A、及び1 % F リトンX - 100を含む20 p 8 の溶液と混合し、37 でに16時間維持した。それから、この酸グリコシル化した废物を、先に述べたS D S ー P A G E で分析した。

第7回、レーン4及び5に示した、放グリコシル化の研究結果は、58kDaのhuTPは、Mのタンパク質部分、すなわち軽額の存在のため、47kDaのものよりも、高い相対分子量を示すことを表わしている。

このようにして単離した A u T P を、再店賃化し、そのプロコアグラント活性が再排成された。最高の活性を有する再店賃化組

成因子理物を提供するのに必要な組織因子: 設質比が、 0.1 メB S A を含む B B S パッファ溶液 (20 m M へ ペス、 p H 6.0、 I 40 m M No C & 、 0.0 1 メアジ化ナトリウム) 中、 建々の環度となるように、上述の得られた早鮮 h u T F を搾かすことにより実践的に測定された。 それから、 複々 b u T F 希 駅 物を以下に 述べるように再 距 質化し、 さらに、 例 2 で 特 告されている 森 集 検 定 法 で 滅 定 された、 最 も 高 い 活性 を 示す 比が、 後 の 使用の ために 準備された。

再除其化には、各トッTFפれ物100mをを、100mをの RBPL溶液、0.76mをの1%ウシ血液アルブミンを含むH BS溶液(HBS/BSA)及び40mをの100mM塩化カドミウムと混合する。この混合物を2時間、37℃に維持し、ついて、ここに含まれるカロTF活性を、例2で述べた最無検定法で 測定した。

5. ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の作成

### 特表平1-503438 (19)

全てのハイブリドーマは、6~8週間の年令の、スクリプス・クリニック・アンド・リーサーチ・インスチチュート、動物飼育場から入事できるメスのBalb/cマウス由来の際疑細胞を用いて作成された。

#### a. マウスTFBの免疫化

例4で調整した観知性単雄化カロTF5マイクログラムを100 ロボールとなるよう生理支塩水に溶かし、MOHハミルトンの リビ・イム/ケム・リテーチ社から入手したR-700アジュパ ントと1:1の割合で混ぜ:エマルジョン化した。ついで、この エマルジョンをマウスTF8に皮下注射した。

このマウスTFBは局様に、約2週間後、変性 h u TF及びR
ー700アジュバントを含むエマルジョンの接種を受けた。変性
h u TFは、0.09 メトリトンメー100、0.83 %SDS、
0.2 Mー2ーメルカプトエタノール及び270μg/mg h u TH
を含むTBS(150 mM CaC f m 、 50 mM トリスーHC f (pH 7.5) を、5分間無沸して調製した。その後、この変性した h u TFを、等容費の、0.6 mg/mg マウス血清アルブミンを含む生理食塩水と混合した。つづいて、4倍容のアセトンを、この変性 h u TF溶液に混ぜ、生じた混合物を、一険、一20 でに 保った。生じた社殿を約13000×g、10分間の遠心で曇め、4:1(マ/マ)のアセトン:水で一度洗浄してから、0.1 mg/mg の埋度となるよう、200 μg の生理食塩水で製物した。

最初の注射から、約4週間後、0.1mg生理食塩水中33μgの規和性単離化カロTFを、0.1mgの完全フロイント・アジュパント (cPA) と混合し、エマルジョンを作り、これをマウスTF8に関連内性射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸緩衝食塩水中15μgの観和

ム・パイオケミカルズ)をイムロン・36穴フレキシブル・ビニルマイクロブレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃を維持し、JaGをウェルの壁に吸着させた。 TBSで3回洗浄した後、3%オパルミンを含む100μ2の TBSントリトンを各ウェルに入れ、過剰のタンパク質結合部位

ウェルを、1時間、約20℃に競技したのち、そのプロッキング溶液を、アスピレータで除いた。そして、各ウェルに50μgのハイブリドーマ培養上清を加えた。できた固被相免疫反応混合物を1時間、37℃に維持した。その徒ウェルをTBSで3回洗浄し、追刺の根は、アスピレータで除いた。

例4で調製した、TBS/トリトン中、およそ1mgのカuTFと、およそ5×10°cpmを含む、50円2の1mm1ラベル化カuTFを各ウェルに入れ、第2の固液相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した 1mm1-huTF含有免疫反応産物を準離した。週剰の液体はTスピレータで除る、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り離し、各ウェルに含度れる1mm1を、ガンマカウンタで計致した。

パックグランド放射器性(huTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当り、平均約200~300cpmであったが、一方、huTPと抗体の反応が有る場合は、ウェル当り10000cpmのカウントがある。抗huTP抗体の生産が正と検定されたハイブリドーマを退択し、本発明のハイブリドーマとした。つづいて、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・ブロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・ブロット・イライザ法

をブロックした。

例 4 で調製した、アセトン沈殿したカロサドを、 4 : 1 (v/v)

性単離化トロTFを静脈注射(1. v.)し、閉じトロTP/ PBS接種を2(時間後にも行った。そのマウスTF8の御細胞を融合のため3日後に採取した。

#### b. マウスTF9の免疫化

マウスTFSは、2回のサビ・アジュバント注射に、エマルジ ・ン化前に変性したhuTFを用いること以外は、マウスTF8 と同じ接種スケジュールがほどこされた。さらに、第1回目の PBS接種の難腔内注射をCFA合有接種後4ケ月半後に行なった。

#### . c. ハイブリドーマの作成

TF8及びTP9由来の酵却酸に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の酵和酸的1×10°個を、30%ポリエチレングルコール (PEG4000、ATCC25322ー68-3)を含む200メ4の融合媒体中、2×10°のP3X63Ag8.653.1ミエローマ和酸と混合した。和腔融合後、生じたハイブリドーマを96欠プレートに短短し、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチモジン)中で培養し、つづいて、huTFと反応する資体分子生産能でスクリーニングした。

阿マウスTF8及びTF99神知助由来の融合体共、HAT融合 媒体耐性ハイブリドーマ細胞クローンを生じた。TF8融合体は 90.7個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF9融合体は、 348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

抗ねuTF抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリーニング

#### a. 適相R J A

TBS中、20με/maに発釈した100μεのヤギ拭マウスlaG (1N州、インデアナポリス、ペーリンガー・マンハイ

のアセトン:水溶液で抽出した。残存する状況をTBS中に20 PBブ の となるように懸露した。このAuTP溶液20PB (1PB) を、消えないインクで、BAB3ニトロセルロース紙 (シュレイチャー・アンド・シュエル、NH州、キーン)上に書いた数字の頃にスポットする。スポットしたAuTFを空気乾燥 し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個々のディスクを、BLOTTO(ジョンソン(Johnson)等、ジェネッティック・アナリティカル・テクニック(Gene. Anal. Tech.) 1巻、3頁(1984年))を含む、多穴トレイの個々のウェルにほし、約1時間、37℃に維持した。

このBLOTTOを、ウェルからアスピレータで除き、各ウェルに、200ggのハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37mに保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトブロットは瀬キットの(MI州、アン・アーパー、プロメガバイオテク社)アルカリホスファターゼ結合抗マウス 1 g G を、BLOTTOで 5 7 0 0 倍に箱駅し、このペーパーディスクと接触させた。このプロトブロット溶液との接触を、3 7 で 3 0 分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3 回 洗浄した。兼者の指示に従い、プロトブロットキット中に合まれている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファクーゼが検出される。

### c. ウェスタン・ブロット検定法

ウェスタン・ブロット検定のため、例 4 で報告したように単輝 した約 1 0 μ g の h u T F をサンプルパッファ (2 M S D S 、

## 特表乎1-503438 (20)

5 0=Mジチオスレイトール、10%グリセリン)に沿かし、5 分買、束縛した。それから、これを、レムり(Leensli)により程 告された(ネイチャー (Mature) 、228巻、680頁 (1970 年〉)、参考としてここに超込まれている、予め築色された分子 貴禄準の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードす る、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲ ル電気泳動にかけた(分子量標準:MA州、ニュートシセンター、 ディパーシファアイド・パイオテク社)。 参考としてここに組込 まれている、トウピン(Toubla)等(プロシーディング・イン・ナ ショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Fatl. Acad. Sic.) DSA, 7 6 巻、 4 3 5 0 其(1 9 7 9))により報告されて いるように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気ブロッティ ング後、このブロットを、TBS中の5%放駐粉乳溶液でブロッ クレ、マニホルドに固定した(M A 州、ケンブリッジ、イムネチ クス社、ミニブロッタ)。8個のハイブリドーマ転散培養上渡の ストックを、各マニホルドスロットにロードし、31cc1時間 インキュペートレた後、このブロットを取り除き、TBSで洗浄 した(0.02%アジ化ナトリウム合有TBS)。 抗体が結合した レーンを、発色物質で発色させたアルカリネスファターゼを結合 した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可視化した (W1州、マジソン、プロメガパオテク、プロトブロット)。 陽 性のストック由来の培養上清を、5%放脂効乳TBSによる8倍 希釈物について、別個に買テストし、抗力を抗体を生産する個々 のハイブリドーマクローンの同定を行った。

抗トロTF抗体度生が正と判断されたハイブリドーマをさらに 特徴づけるために選択した。例えば、上記のTF8融合休由来の ハイブリドーマは、例6トで述べられているドット・ブロット検 定台及び別6cで这べられているウェスタンプロット決定法で h u T F との免疫反応を、そのハイブリドーマ培養と特徴づけられる。これらの特徴は、24個のT F 9ハイブリドーマ細胞系列について みられ、そのほとんどは、例13の第5表に示した。その他のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより産生される抗体分子は口脚細胞を独自の融合体に提供する免疫化でウス(すなわちT F 8 又はT F 9)、及び、独特のHAT培地耐性ハイブリドーマ細胞が単離される、96六培養プレート、残る号及びウェル番号を示す文字によって呼ばれる(すなわち、5 B 7、11 D 12、その他)。特殊な意味の文字は、155、ハイフン婦又は2日として、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している:T F 8 - 5 G 9 及びT F 8 - 5 G 9 及びT F 8 - 5 C 9。

### 7. イムノグロブリンIaGの単端

イムノグロブリン I E G は、製造業者の指示に従がい、パイオラドラボラトリーズ M A P S B システムを用い、マウスのハイブリドーマ細胞系列 T F 8 - 5 G 9 (A T C C 第 H B 9 8 8 2 号)を含むマウスの腹水液から単層される。単離しだ I E G のタンパク質速度は、製造業者の説明書に従がい、B C A タンパク質検定は取(ピアスケミカル社)を用いて制定した。

### 8. huTFの免疫観和性による単脳のための、抗トuTP合有 面体サポートの回路

抗カロTP抗体を、アガロース固体マトラックスへカップリングするため、少なくとも1回透析被交換を行う、0.1M MES、pH6.5を含む500eMの透析パッファに対する、4で、16時間の、例7で報告したように開製した、MAPS単離TP8-

5 G 9 モノクローナル放体 1 0 mgの透析により、液性化した、活性化したTF8-5 G 9 を、2 mgのアフィゲルー 1 0 アガロースピーズ (バイオラド) と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造乗者の指示に従かい処理して、TF8-5 G 9 / アガロース団体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をブロックし、洗浄後、被圧諸憑して、TF8 -5C9/アガロースケーキを作った。

### 9. カロ丁ドの免疫競和性による単独

ヒトの福のおよそ半分、すなわち約100mmに等しい、例1で掲載した協協出接液を、計6mmのパッファAに対し、2回の外液交換をしつつ、4でで3日間透析した。その透析した拍出物を1.5時間、10.000×mmで減心した。できた上滑を、例4で調製したグリンンエチルエステルーアがロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間変温に維持したのち、その固摺と板相を焼枯ガラスロートによる透過で分離した。そのカロTF含有液相を回収し、例8で調製したTFmmに混合し、回ノ液和免疫反応混合物を作った。

上述の洗浄後、その固体サポートに免疫学的に結合している buTF、その固体サポートを、焼結ガラスロート上に保持した まま、Q.1 Mグリシン、 pH 2.5及び 1 %トリトンメー100 移 液 2 0 m 4 で洗浄することにより、関放 (容出) した。それから、例 4 に全て透べたように、溶出物質を回収し、 h u T P 検定を行ない、集めて透析した。

透析物をも倍容の冷アセトンと混合し、カロTPタンパク質を 沈段化した。さらにこの沈段をおよそ~10℃、5,000×g、 30分の速心で無めた。生成したペレットを宣崇雰囲気下で乾燥 し、そのペレットの一部を変性条件でのSDS-ポリアクリルア ミドゲル電気泳動で分析した(SDS-PAGE)。

類8図に示したこの分析結果は、 h n T F が免疫超和性により、 脱脂指効末1グラム当り、 3 3 mgの h n T F の収率で単型される ことを示している。

## 10. 抗huTF抗体による凝集の阻害

10 m 4 のハイブリドーマ培養上滑を、例4 で課題した約2 m を の 再 取 質化 h u T F を 含 0 m 4 の H B S / B S A と 混合した。 このようにして作った免疫反応 混合物を 3 0 分間 3 7 七に 保 ち、抗 b u T F 抗体分子を免疫学的に h u T F に結合させ、免疫反応 座物を形成させた。つづいて、この免疫反応 混合物について、例2 で 述べたように、 h u T F の プロコアグラント 活性を検定した。 オガティブ・コントロールとして、 無関係の I \* C 調質物を抗 h u T F 抗体の代りに用いた。

効果的 h u T F 濃度は、インヒビターの存在下濃定した最直時間を用い、例 2 のように作った模準曲線から外挿した。間害は、用いた実際の h u T P 濃度について、効果的 h u T P 濃度の比率として表わされる。少なくとも 5 0 パーセントの履客をするモノクローナル抗体分子類製物は、本発明の抗体分子成分を中和するものとして選択された。

٥

例5に述べたように、単離したhuTFに対して生じたハイブ リドーマ由来の数多い均乗上波を、凝集開始を阻害する能力につ いて、先の操作により測定した。有意に凝集を阻害することが分 ったハイブリドーマを、第5妻に示した。

また、抗 A u T F 抗体による凝集阻害は、予め形成された ho J F - 因子を複合体を用いて行った。例4で閲覧した再設質化した A UTP 1 maを含む1 0 p 4 を、HBS/BSA 7 0 p 2、20. BM塩化カルシウム10μℓ及び、例3で述べられているように 頻製した因子的 2 5 mgを含む 1 0 μ ℓ と混合する。この混合物を 15分間37℃に保ち、カロTFを、進合物として使える因子は と複合体をつくらせる。その後、10g8の溶液に、例7で述べ たように諷観したMAPS-単離化モノクローナル抗体約1 Cng を混合し、この第2の混合物を、30分間37℃に保った。さら に、第1に20mM塩化カルシウム100μよついで、ヒトのク エン酸化血珠又は例12で述べてように調製した因子で欠損血機 を加え、ついで沙で支わされた森直時間を観測することにより、 生成した混合物の凝集阻害の測定を行った。併10で述べられて いるように、阻害率を表わし、予め形成したhuTF-因子を進 合体での阻害の結果を、第68衷に示した。・

第 6 골

抗カロTFによるカロTP-因子な佐存の森集阻害 1. クエン酸化ヒト血漿による凝集。

抗 体	因子VI·	阻害率
ブランク・	+	. 0
TT85G9	+	58%
コントロール・	+	0
T F 8 5 G 9	_	8 3 %

複合体により開始する凝集を阻害する能力を有意にもつと考えた。 これらのM · A bには、TF9-1B8、TF9-5B7、TF 8-5C4、TF8-11D12、及びTF8-21F2がある。 11. ポリペプチド合成

ここで使用されている種々のhaTFh領域に対応するポリベ プチドをハゲンメイヤー( Hagenmaler )等(ボップーセイラーズ ( Hoppe-Seyler's ) Z。フィジオロジカル・ケミストリー、353 巻、1973頁(1982年))のシンメトリカル・アンハイド うイド法を用いたアプライド・パイオシステムズモデルもSOA ペプチド合成機で化学合成した。第1及び第2妻のポリペプチド に加え、以下に示す第3表のポリペプチドも合成し、これには、 huTFhと反応できる抗ポリペプチド抗体の生皮に有用な、木 発明のポリペプチドが会立れている。

> 第 3 表 抗原性ポリペプチド

### 12. ポリベブチドによる凝集阻害

huTF依存の凝集開始を疎開する、本発明のポリペプチドの 能力を、まず、このポリペプチドを因子VI/VI a 及びカルシウム イオン存在下でインキュペーションし、さらにこの混合物を、因 子MノMa欠損血器に加えて、凝血時間を見積った。

ヒトの因子な/ススュを例3に述べた方法で単型した。HBS/ BSAm # 当り、この単難した因子VI/VI200m # の溶液 10 # # に、100 # # H B S、20 # # 2 5 m M Ca C # . 及び100

コントロール 1. 因子切テプリート化ヒト血禁 统 体 因子证 阻害率 プランク D T.F 8:5 G 9 5 8 % コントロール

- \* ブランク \* とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなか ったことを示している。
- b. "TF85G9"とは、ハイブリドーマTF8-569から 単雄したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。
- c. ゜コントロール゜とは、検定で無関係なモノクローナル抗体 を用いたことを示している。
- 4. "+"は、抗体を混合物に加える前、因子70を加え、精製し たhuTFと複合体を形成させることを示す。

抗カロ丁F抗体による森無風害の別の研究が、TFを因子リノ VI a と会合させ、TF:因子VI/VI a 複合体を形成させる前後の 囮害を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTF:VI/Wa複合体を用いた 抗カロTFN抗体による凝無限害を、利用するモノクローナル抗 体合有溶液10g8にMAPS単離化モノクローナル抗体含有溶 彼の代わに、ハイブリドーマ培養上清を用いた以外、例10で述 べたのと基本的に同様に行った。比較のため、抗ねっTF抗体に よる凝集阻害を、例10で述べたように、因子な/ほぁを含むク エン酸化血法との混合の前、それら抗体及び再脂質化カッTPの 免疫複合体を形成することにより検定した。

ここで述べている金での抗体は、この比較阻害設定試験を行っ たが、約60%以上の阻害を示すものだけが、huTP:14/14。

µ 4 の合成ポリペプチド会有TBS/トリトンを加えた。 種ャの 渥皮で含まれる多種の混合物をこのように調型し、それを、15 分間、37℃に維持した。例4で述べたように誘要した再辟質化 した組織因子を、HBS/BSAで錯択し、例2で述べたような **萩集検定法でテストしたとき、10μgでおよそ45秒の凝集時** 間が得られるように調整した。上記のように維持した混合物をさ らに、再胎質化カロTF10μ & 希釈物、25mM CoC & s100 μ & 及び 1 容の血漿に対し 1.5 容の H B S で希釈した因子 11/11 a 久摂血共100×8(K A 州、オーバーランド・パーク、ジョー ジ・キング・パイオメティカル社)と流合した。凝血時間の延長 は、この合成ポリペプチドによる豪族の孤喜を示していることに なる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくと も30%の凝無阻害を示すポリペプチドはhoTPA結合部位ポ リペプチド類似物、すなわち;第4表のセクション1で示されて いるポリペプチド、p26-49、p146-107及びp161 - 1 8 9 T & & .

別に、上記回客検定において、モノクローナル抗体による免疫 顕和性吸着により、因子Ve/Ve》欠損血費である因子Ve/Ve》欠 議血漿を用いた。ヒトの因子VI/VIaに対するモノクローナル抗 体を、例3で述べたように単離した因子VI/ソリュをhuTPの代 かに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様 に頻製した。できたハイブリドーマを、イライザ法で評価し、 1N州、サウスベンド、エンザイム・リサーチ・ラボラトリーズ 社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質 S 、因子1X、 因子X及び因子Bと反応しないハイブリドーマを同定した。その ようなハイブリドーマ、FV11、F1、2H3-32は、7.5. エジントン( Edgingtom ) 博士から歌いた (CA州、ラジョラ・

スクリプス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション社)。イムノグロブリンI g G を、ハイブリドーマF V I 1、F 1、2 H 3 - 3.2 を含むマウスの20水から単層し、この単層したI g G を、例 8 に遠べたように、固体サポートに結合させた。できた抗因子 V I フェーナル抗体含有固体サポートを貯留した正常なクエン酸化血胀から、血腫含有液相を収穫し、保留すること以外、例 9 で述べた免疫製和性操作を用いて、因子 V I / V I a を駄くのに用いた。

取賞化型で用いたとき、競合的に凝集を阻害する、いくつかの ボリベプチドの能力を、100m2の合成ボリベプチド溶液の代 りに、100m2の設置化合成ボリベプチドを用いることにより 上配検定法での評価を行った。

脂質化合成ペプチドは、合成ポリペプチドを、単離したbeffの代わに用いること以外は、単離したbefpの再脂質化で用いた、例もで述べた方法で関製した。ルーチンには脂質とポリペプチドの比は52:1(マ/マ)が用いられた。少なくとも30%の番集阻害を起こす脂質化ポリペプチドが、腐質化型で存在するとき、buff結合部位ポリペプチド級個物すなわち、第4表のセクションIIで示されたポリペプチドと考えた。

第 4 表

## h u T P h のポリペプチド類似物の h u T F による凝集開始の阻害

~/71	, 121 <del>15</del>	
1、非リン胆質化ペ	ブチド	潍 度
P 1 - 3 0	2 5. 0	10 u M
p 2 5 - 4 9	8 8 8	10 u M
p 4 1 - 7 1	2 5. 0	10 m M

t.

50 μ & のハイブリドーマ培養上滑を各ウェルに入れ、1時間 37 ℃に維持した。さらにこのウェルをTBSで3回洗浄し、過 刺の液体をアスピレータで除いた。

単離化トロTFは、例3で述べたように、免疫観和性カラムで 調製した。単離化トロTFを含むアセトン沈殿をTBS/トリト ンに溶かし、そのタンパク質濃度を、製造業者の説明書に従がい、 BCAタンパク質検定試施(ピアス)を用いて測定した。トロTF の説化水素側側を、オシャネシー(0'shansessy) 等の報告した 方法(イムノロジカル・レターズ(lasnuol. Letters)、 B 巻、 213~227頁(1984年))に従がい、ピオチンーヒドラ ジド(NY州、プレインピュー、 J C N パイオメディカル社)を 用いて、ピオチン化し、ピオチン化トロTF溶液を作った。

TBS/トリトン中60ヵg/mgに関盟した50μgのピオチン化カロTF溶液を、5μM合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1時間、37にに維持した。その後、このウェルをTBS/トリトンで3回洗掛した。

5 mM EDTA、0.5 MトリトンX-100及び1%BSA を含むTBSで1/100に帯釈した、100pgのストレプトフビジン-結合アルカリホスファターゼ (NYH、ニューヨーク、エンゾバイオケム社、デテク1-alk) を各ウェルに入れ、30分間、37 にに維持した。その後、このウェルを、10mMリン設カリウム (pBS5)、2%BSA、0.5%トリトンX-100、0.5 M塩化ナトリウム及び1mM EDTAを含む溶液を4回洗い、ついで検出バッファ (0.1 Mトリス・塩酸 (pBS8)、0.1 M BmC4、5 mM MgC4。) で1度洗った。

その後、技出パッファ中、2×Mのpーニトロフェニルリン数

	12 34 T I	303438 (2
p 4 0 ~ 4 9	2 5. 0	1 0 u M
5 6 - 7 1	2 5. 0	10 u M
p72-104	2 δ, 0	10 u M
p 9 4 - 1 2 3	2 0. 0	1 0 u M
p 1 2 1 - 1 5 5	1 0, 0	10 v M
p 1 4 6 - 1 6 7	8 7. 5	10 u M
p 1 5 1 - 1 8 9	3 2. 5	10 u M
p 1 8 0 - 2 0 9	2 0, 0	1 0 u M
p 2 0 4 - 2 2 6	2 0. 0	10 u M
なし	0	-
1. リン脂質化ペプチド		-
p I - 3 0	8 1. 0	1 0 m M
p 2 6 - 4 0	8 3. 0	10 u M
p 4 0 - 7 1	6 5. 0	10 u M
p 5 0 - 7 1	7 3. 3	3 Ó u M
p 9 4 - 1 2 3	9 3. 7	1 0 u M
p 1 2 1 - 1 5 5	5 5. D	1 0 u M
p 1 4 6 - 1 6 7	9 0. 0	1 0 u M
p 1 6 1 - 1 8 9	9 4. 0	1 0 u M

2. 残12で送べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド阻害研究で得られた代表的投与 - 広答曲線 を第9及び第10回に示した。

13.ポリペプチドによる抗体-huTF免疫反応の阻害

フレキシブルビニルでできたイムロンU底 9 6 穴プレート (ダィナテク社) のウェルを透刺タンパク質結合部位のプロッキングを、37 で 2 0 分間行うこと以外、例6 で述べた方法ですず抗マウス 1 EG (ペーリンガーマンハイム社) によりコーティングし

を含む溶液 100 p x を各ウェルに加え、1 時間 5 7 でに維持する。ついで、405 ナノメーダーでの光学密度を各ウェルについて、パイオ・テク・マイクロプレートリーダー (V T 州、ウィノースキ、パイオ・テク・インスツルメンド) を用いて測定した。この類合的阻害研究の結果を第5度に示した。

### 泵 5 衰

モノクローナル抗体とペプチドの相互作用の表 \*\*Bad\*\*\* pl p26 p40 p41 p56 p72 p94 p121 p146 p161 p190 - 30 -49 -71 -49 -71 -104 -123 -155 -167 -189 -209

	50	- 43	-11 -43	- 12	-104	-123	- 133	-101	-103	- 203
7F85G9		+								
TF811D12	•									
1F85C4			•			•				
1F821F2				+						
7 F 9 1 D 5				+		+		+		
1F92C4			+	+		+		+		
1F92F6					•				•	
1F95C7			•	+		+		•		
TF96B4				+				+		
TF99C3			+	•		•		•		
TF910C2				1				•		
TF81F1		•								
TF91E7					•					•
TP9188			+					•	•	
7F91B9		+								
7F94D11		+	•	+						
179564		+		•						
179517	+	4								
TERREA										

7F910B10\* + +

a. 各モノクローナル抗体 (Mab)は、同名のハイブリドーマによ り度生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、 ハイブリドーマ培養物上滑を用いてスクリーニングした。

b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた;その他の全ての抗体は、同結果に健がい中和性をもつと考えた。

もし、ポリペプテド存在下で得られた吸光皮測定像が、ポリペプテド非存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値値から 1以上の保障保護をもつとき、図書が有意に起ったと考えた。 14.2部位イライザ法による身体サンプルにおけるカロTF検出

血液、血熱、唾液、尿、その他の身体サンプル中のカロ丁戸は、 同じカロ丁戸分子に同時に結合することができる2つのモノクロ ーナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ポリステレンU底96大ブレートを、まず、各ウェルに、TBS中10pg/mをに希釈したIgG100pgを入れ、ついて、ウェルと、IgG溶液との接触を、4で、一晩維持することにより、ヤギ坑マウスIgG(ペーリンガーマンハイム社)でコートした。そのウェルを、TBSで3回洗浄し、ついて、

がAuTFに同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ変えることができる。例えば、第1抗体として、TF9-6B4を用いたとき、TF9-11D12を、TF9-10H10の代りに、第2の抗体として用いることができる。このように、未免別は、本検定性で同時に結合できる複々の抗体の組合せを考案した。
15. 会プレAuTFAコード配列を含むDNA断片の機体

全プレトロTFコード配列を含むDNA断片を第11図にその制限地図に示されている、組換えプラスミドpCTF64、pCTF403及びpCTF814と、この分野でよく知られている操作を用いて構築することができる。例えば、マニアチス(Manlatis)等、NY州、コールドスプリングハーパー、モレキュラー・ラボラトリー、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニング(1983年) 夕照。

第11回で示されている超換えDNAでラスをド中に含まれる 挿入断片は、クローニングを可能にする、各来端のBcoR1リン カー5・一6GAATICCー3・(MA州、レキシントン、コラボラチ ブリサーチ社)を有している。これらのリンカー配列は、天然の カロTF h DNAコード区列の一部ではないので、第2回に示 されるスクレオチド配列中には存在しない。超換えDNA分子構 旋の説明は、関係するカロTF h DNA配列についても明らか なように、BcoRI末端を含む情化により生じ、これらの付加的 なリンカー配列を含む断片は、第2回で示したスクレオチド塩器 番号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら付 加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミドpCTF64を、制限エンドスクレアーゼEcoRl 及びDramで消化し、第2図で示される、塩香残あ1~296番 に対応するヌクレオチド配列を含むDNA所片を作った。このよ 各ウェルに、 3 × B S A を含む T B S /トリトン 1 0 0 μ g を加えた。 その後、 これらのウェルを 1 時間、 3 7 でに維持してから、 T B S で 3 回洗浄し、さらに、 追刺の液体をアスピレータで除いた。

第1のハイブリドーマ、TF3ー6B4由来の抗トロTF抗体 分子合有培養上清100mlを各ウェルに入れ、1時間37でに 維持した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、ついで過剰の液体を、アスピレータで除いた。

例9で成製したように、免疫製和性単離し、アセトン状段化 カロTFを、TBS/トリトンに溶した。このカロTF溶液の粉 駅物をTBS/トリトンで 5 mg/mgから 0.5 mg/mgの範囲 で調製し、特釈液 100 mgをイムロンプレートのウェルに入れ た。このカロTF常釈液を、第1の抗体と接触させ、1時間 3 7 では練持した。さらにこの希釈物をウェルから除合、ウェルを TBS/トリトンで 3 回旋停した。過剰の液体をアスピレータで 味いた。

抗トロTF抗体を、例りで述べた方法により、第2のハイブリドーマTF9ー10H10の腹水からMAPSで単離した。この 抗体溶液のタンパク質を測定し、ついで、例13で述べたように ビオチン化によりラベル化した。

このピオチン化した抗ねロTF抗体をTBS/トリトンで60 ロ g/m g に希釈し、この溶液100 p g を各ウェルに入れた。 そのウェルを1時間、37℃に粒持し、ついでTBS/トリトン で3回流った。

この結合した、ビオチン化抗 h u T F 抗体を、例13で述べた アテク1-sik システムを用いて検出した。この検定法で第1及 び第2の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その2つ

うにして作った、302ヌクレオチド塩高対 (bp) 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により早難し、アルカリホスファターゼを用いた処理により脱リン弦化した。

プラスミドPCTF403を制限エンドスクレアーゼをcoR1で消化し、第2図の残器775~1125番に対応するヌクレオチド配列を含むDNA断片を作った。生成した352bpの断片を、アガロースゲルを用いたライズ分面により単難した。

プラスミドPCTF314を、制限エンドスクレアーゼEcoRIで構化し、生成した647bpの断片をサイズ分泌で早越した。この断片は、第2図の残薬135~775番の配列に対応するスクレオチド配列を含んでいる。647bp断片をサイズ分泌で早越し、アルカリホスファターゼで脱りン酸化した。

この352か断片及び限りンは化した647か断片をす4DNA リガーゼの反応によって複能的に結合(ライゲーション)し、第 2回の残器135~1125番に対応するヌクレオチド配列を育 する999かの断片を作った。

さらに、この999bp時片を、製取エンドスクレアーゼ Dramで消化し、第2回の残器 296と297者の間でこの999bp時片を切断し、これによって、168bpと831bpの時片が生ずる。さらに設りン設化した302bpの断片と、831bpの断片をT4DNAリガーゼで機能的に結合し、第2回の1~1125者に対応するスクレオチド配列を含む1125bp断片を作った。

PcoRlで消化して、クローニングプラスミドベクターpUC 8を級状にした。先に調製した1133bp所片と、EcoRl消化 したベクターをTIDNAリガーゼで破絶的に結合して環状組換 えDNA分子pUC-プレカロTPhを作った。

大陽圏RR1株(MD州、ゲイサーズパーグ、ベセスダ・リサ

ーチラボラトリーズ)をpUCープレカロTPAでトランスホームし、そしてアンピシリン耐性に基づいて、トランスホーマントモ選択した。それから、この選択したトランスホーマントモクローン化し、プレカロTPA構造遺伝子をもつ超換えDNA分子の存在によりスクリーニングした。

プレカッTFト構造違伝子をもつ組換えDNA分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスホーマント由来のrDN人をEcoRIで消化することによって行った。生じたEcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分解した。352bp、781bp及び2682bpのDNA断片に対応する三つのパンドパターンを示す組換えDNA分子でプレカッTFト構造遺伝子の存在を確めた。上述のEcoRI消化パターンを生するrDNAを有する大場面RRIトランスホーマントは、本発明の組換えDNA分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

相聴外アンカー領域を含むが、カルボキシル末端にトランスメンプレン・アンカー領域を欠く、プレカロアドカコード配列の実質的領域を含み、従って、可容性カロアドカタンパク質をコードするDNA時片を次のように構築した。

プラスミドPCTP64を制限エンドヌクレアーゼEcoRJで 流化し、第2回の1~486番の残酷に対応するスクレオチド配 列を含むDNA断片を作った。このようにしてきた486bpの断 片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、その後、ア ルカリホスファターゼ処理で放りン酸化した。つぎに、このよう に成りン酸化した486bpの断片を制限エンドヌクレアーゼDra 耳を用いで消化し、第2回の296番と297番の間の部位で、 4.86bp断片を切断し、296bp及び190bpの断片とした。こ の296bpの断片をフガロースゲルのサイズ分画で単離した。

(1983年)) の方法に従がい、互いにオリゴスクレオチドが 複能的に結合するのを防ぐため、ポリスクレオチドキナーゼによ カリン政化を行なわれなかったこと以外は同様にして、

5 ' - AATITAGAGAATAAGAATTCEGG - 3 '

3 ' - ATCTCTTATTCTTAAGCCC - 5

の配列をもつ、合成オリゴヌクレオチドアダアター断片を作った。このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着 EcoR 1 末端を含む二本額 DNAリンカー断片を作り、ローザースタイン(Rotherstells)の方法(メソッズ・イン・エンデイモロジー(Botheds in Enzymol.)、5 8 巻、3 8 頁(1 9 7 9 年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリンカー断片を、p U C ープレカ・1 F b ー Tから得た7 7 5 bp 断片に機能的に結合し、7 7 5 bp 断片の各末端に1つのアニール断片を含む8 1 7 bp 断片を作った。その後、この8 1 7 b p 断片をEcoR 1 で消化し、8 1 7 bp 断片の各末端を平滑から EcoR 1 粘着末端へと転換し、8 0 5 bp 断片とした。この8 0 5 bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単階した。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRlで消化 し級状化した。先に調製した805bp断片とEcoRl消化したベ クターをT4DNAリガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換 えDNA分子pUC-プレApTPA-TRとした。

大場関RRIをp UCープレねuTPカーTRでトランスホームし、p UCープレカuTFカーTRを含むクローンである、アンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

16. 規模えカロTPトコード配列の発現に反カロTPトの生産 組換入DNA分子由来の組換えカロTFトの発現は原核性細菌 細胞、非脊椎実体性細胞及びより高等な(脊椎)実体性細胞を含 プラスミドゥCTF314を制限エンドスクレアーゼ EcoR 1 で消化し、第2回の135~775番の残器に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。この641 bp 断片をアガロースゲルモ用いたサイズ分画で単類し、ついで、アルカリホスファターゼ処理により取りン酸化した。この取りン酸化した641 bp 断片を、Dromaで消化し、第2回の296番及び297番の間の部位で、この641 bp 断片を切断し、これにより、162 bp 及び479 bp の断片とした。このうち、479 bp 断片をアガロースゲルモ用いたサイズ分面により異難した。

上述のように周親した296bp及び419bpの筋片を、T.4 DNAリガーゼを用いた反応により機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の1番から775番の配列に対応するスクレオチドアグプター配列を有する775bp断片を作った。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRIによる 活化で譲せ化する。上記のように調整した175 bp 断片と、 EcoRI清化ベクターをTIDNAリガーゼで機能的に結合し、 環状組換えDNA分子pUCープレカロTFA一丁を作った。

大陽爾RR1を、pUC-プレトロTFh-丁でトランスホームし、pUC-プレトロTFh-丁を含むクローンであるアンピシリン同性トランスホーマントを選択した。

組換えDNA分子pUCープレトロTFh-丁を5coR1で消化し、生成した175bp 断片をサイズ分画で単離した。

カルーザース(Carothera) 等 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.)、103 他、3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等 (コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・クオント・パイオロジー(Cold. Spring Barbor Symp. Quant. Biol.)47巻、393

a. 大路面におけるプレカロTFAの発現

大陽園において、プレトロサドト構造遺伝子を発現できる組換えDNA分子は、例15で作ったpUCープレトロサドト組換えDNA分子由来のプレトロサドト遺伝子含有DNA断片を単離し、ついで、この断片を原核性発現ベクターに機能的に結合することにより構築することができる。

関換えDNA分子pUCープレトuTPhを、そのプラスミド中に存在するEcoR1部位を部分的に切断するような条件で、EcoR1請化する。この部分核化法は、アニアチス(Baniatis)等、NY州、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー、コール・スプリング・ハーパー、モレキュラー・クローニングにより評価に報告されている。図2の残器1番から、1125番で示される配列に対応するヌクレオチド配列を含む1133Ыの断片を、サイズ分画によりEcoR1部分分解を動かる単細した。

原核性発現ベクターp K K 2 2 3 - 3 (N J 州、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、 E co R I による消化では状化した。 この消化ベクター及び I 1 3 3 bp プレカロ T F b 構造遺伝子合有断片を T 4 D N A リガーゼを用いて確能的に結合し、選択組換え D N A 分子 p K K - プレカロ T F b を作った。

大場間 R R 1 を p K K ープレ b v T F b で F ランスホームし、 p K K ープレ b v T F b 含有クローンとしてアンピシリン耐性 F ランスホーマントを選択した。

#### b. 大陽菌におけるhuTFhの発現

大場面において h u T F 遺伝子を発現することができる組織え D N A 分子は、例 1 6 a で興製した 1 1 3 3 bp断片を操作して標 添した。まずこの断片をアルカリホスファターゼで脱リン酸化し、 ついて、制限エンドヌクレアーゼ B bv 1 で 情化した。生じた964 bpの断片は、第 2 図の残器 1 6 4 ~ 1 1 2 5 書に対応するヌクレ オチド配列を含んでおり、サイズ分画により早知した。 先に述べたように、

#### 及び

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作り、ロザーステイン ( Botherstein )等 (メソッズ・イン・エンザイモロジー ( Nethods in Enzypol. ) 68巻、98頁 (1979年)) の方法に使って、特者 P.Co.R.I. 及び B.bv.I. 末端を含む二本値 D.K.A. リンカー断片をアニーリングすることにより作った。このリンカーをまず954bp 断片に機能的に結合して、1008bp 断とした。ついで、1008bp 断片を、T4D以Aリガーゼを用い、E.Co.R.I. 消化したベクター p.K.K.223-3と機能的に結合し、環状組換えDNA分子 p.K.K.-A. u.T.F.h.を作った。

組換えDNA分子 pKK-buTFhは、pKK-プレ huTFh と、(1)残差1~129番の残菌がない、及び四新しいメチオニンコドンが、残益130番の前に機能的に結合しており、その結果 タンパク質発現 (翻訳) が挿入されたメチオニンコドンの場所で 始まることだけが異なる。

超換えDNA分子 pK K ープレカップ F ね及びpKK ー bujFbを、その中に含まれる構造遺伝子によりコードされるカップ Ph

た。それからこの選択したトランスホーマントをクローン化し、 モノクローナル抗体TF8-5G9を用いて、発現するプレ カロTFカタンパク質の存在を各クローンについて検定して、 pSVープレカロTFカの存在に関する選択を行った。 d. CHO細胞におけるカロTFカの発現

本乳類初節において、 h u T F h を発現することができる組換え D N A 分子を、例 1 6 c 由来の p S V ープレ h u T F h を、制限エンドヌクレアーゼ B a l I で 情化することにより 排棄した。生成した 1 1 5 3 b p 断片をサイズ分画で早難し、つづいて、制限エンドヌクレアーゼ B b v I で 清化した。生じた 9 7 4 b p 断片は、図 2 の残益 1 6 4 − 1 1 2 5 香の配列に対応するヌクレオチドアダプター配列を含み、これを、サイズ分画により早難した。先に述べた方法で、

### 及び

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を合成し、アニールして、粘着性Bell及びBbvl来端を含む二本版DNAリンカー断片を作った。ついで、このリンカーをT4DNAリガーゼを用いて974bp 断片に複能的に結合して、第2図の残塞130~1125番の残蓄の配列に対応するヌクレオチド配列を含む、1018bp 断片を作った。

プラスミド発現ベクター pXSV-10を、Ballで消化して 級状とし、ついで、T4DNAリガーゼを用いて、1018bp 断片に機能的に結合し、環状組換えDNA分子 pSV-AuTPA を作った。

超換えDNA分子 pSV-プレカロTFh及び pSV-holfb

又はプレカップF A の発現に適合する原故性宿主條件に導入した。 そのような宿主媒体の代表例は、大腸圏R R I 株である。この宿 主を、超数え D N A 分子でトランスホームし、細胞増殖とこの組 換え D N A の発現に適合する条件下で培養し、この発現したタン パク質を従来の技術を用いて収穫した。

## c. CHO細胞におけるプレトロTFAの発現

脊後動物和跛中、プレカップPカ連伝子を発現で含る組換え DNA分子を例16 a で調整した1133bp 断片を用いて構築 した。

カルーザース ( Caruthers )等及びゲイト ( Gait ) 等の方法 . (上記) を用い、

5'-AATTCCCGGG-1'

5 ' - G A.T C C C C G G G - 3 '

の配列をもつ合成オリゴスクレオチドアダプター断片を作った。 ついでこのオリゴスクレオチドアダプター断片を、ロザースタイン ( Rotherstein )等の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー ( Methoda in Enzymol.) 5 B 巻、 9 8 頁(1 9 7 9 年))を用い、1 1 3 3 b p 断片の各来端に結合し、元~1 1 3 3 b p 断片に存在する Eco R 1 粘着来油を、Ball 粘着来油に転換した。

真状性シミアンウイルス (SV40) を基本とする発現ペクター、 pKSV-10 (NJ、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、制限エンドヌクレアーゼ Bel I による情化で縁状化した。 I 1 3 3 bp の Bel I 通合断片及び、 Bel I 補化ペクターを、 T4 DN Aリカーゼを用いて、 機能的に結合し、 環状組換え DN A分子 pSV-ブレ h u TF hを作った。

大馬菌RRIを、 pSV-プレカロTFカでトランスホームし、 アンピシリン耐性のトランスホーマントを選択し、クローン化し

を、内在する構造遺伝子によりコードされるAuTFA又はプレ AuTFAタンパク質の発現するのに適合した実体性値主媒体中 に導入した。このような媒体を含む信主細胞の代表例には、CBO 細胞がある。

语主を、超換えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトランスホーマントを従来法で選択した。例えば、グラハム(Graham)等、ピロロジー( Virol.)、52巻、456頁(1973年)及びサウザーン( Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス( J. Hol. Appl. Genet.)1巻、327~341頁(1982年)参照。トランスネームした宿主初胞を、初胞増殖及びその超換えDNA発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収穫した。

### \*. イーストにおけるプレカロTFhの発現

S. セレビシアエ ( cerevisiae ) において、プレカッTPA 遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、先に述べたように、

5 ' - AATTCCCGGG-3'

5'-00000000-3'

の足列をもつまりゴヌクレオチド、アダプター断片を合成し、ついて別16aの1133bp 断片の末端に、それを結合することにより構築した。このようにして作ったアダプター化した断片は、Cla 1 粘着末端をもつ。

イーストの発現ベクター、 pTDT1 (アメリカン・タイプ・ティシュコレクション、#ATCC31255) を、制限エンドヌクレアーゼClalでの消化により編状化した。上記のClalアダプター化1133bp 断片及びClal消化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、仮旋的に結合し、環状の組換えDNA

分子。ソープレカロTFhを作った。

大事関RRIモブレトu TFトでトランスホームし、プレ b u TFト排造遺伝子を発現するトランスホーマントを、例16 c で述べた方法により同定及び選択を行った。

1、イーストにおけるカロTFhの発現

S. セレビシアエ (carevisiae) において、huTFh構造 遺伝子を発現できる超換えDNA分子を、pYープレhuTFh のClaiによる消化により、第2回の残器1~1125番の配列 に対応するスクレオチド配列を含む1151bp 断片を作ること で構築した。サイズ分画による単類後、1151bp 断片をBbv Iで消化し、第2回の残器164~1125番の配列に対応する スクレオチド配列を含む978bp 断片を作った。この978 bp 断片は、サイズ分画により単難した。

#### 及び

の配列をもつ合成ポリスクレオチドアダプター断片を作り、先に述べたように、アニールすることで、Clal及びBbvl 結構来端をもつDNAアダプターを作った。まず、このアダプター断片を、978bp 断片に観光的に結合することにより、1020bp 断片とした。つづいて、この1020bp 断片を、T4DNAリポーゼを用い、例16eで述べられているように調製したClal清化pTDT1ベクターと結合し、環状銀換えDNA分子pYーbuTFbを作った。

組換えDNA分子 pYープレカロTFA及び pYーカロTFA を、内在する構造遺伝子によりコードされるカロTFA又はプレ カロTFAタンパク質の発現に適合するイースト店主媒体中に導

17. ポリペプチド p2 4 - 3 5及び p1 5 9 - 1 6 9による凝集 阻害

第7表にそのアミノ酸残器配列を示した例11で述べたように 合成した。

### 第 7 選

a、 多ポリペプチド実験名は、第1回に含まれているアミノ散発 各配列を変わしている。

従って、ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9 は未発明の h u T P h ポリペプチド結合部位類似物を示している。 t た、ポリペプチド p 2 5 - 4 9 で得られた同様の結果を考慮すると、 p 2 4 - 3 5 で得られた結果は、 h u T P h - 因子 y y y る結合部位は、これら 2 つのポリペプチドの共通部分、すなわち、

入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、S. セレビシアエ ( cerevisiae ) 細胞がある。

唐主智物を、この組換えDNA分子でトランスホームし、選択 培地で培養して、従来性により、トランスホームした複数を単離 した。例えば、ハイネン ( Blanes ) 等プロシーディング・ナシ ッナル・アカデミー・オブ・サイエンス ( Proc. Batl. Acad. Sci.) USA、75巻、1929頁(1978年)及び、ミヤジ マ ( Hiyajina ) 等、モレキュラー・アンド・セルラー・パイオ ロジー ( Hol. Cell. Biol. ) 4巻、407頁(1984年)参 区。トランスホームした知識を、細胞増殖及び組換えDNA発現 に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を健 来法で収穫した。

8. 組換えねップFねコード配列の発現による可溶性ねuTFね の生志

超換えDNA分子からの可溶性 h u TF h の発現は、プレ h u TF h 及び h u TF h に対し、例18で述べたのと同様に、 様々の発現媒体で行なわれた。その例において、EcoR 1 結着来 端を有する断片を含む1133 b p のプレト u TF h 構造建伝子の例16 b ー f での機像で、大場間、S. セレビシアエ ( carevisise ) 及びCH O 細胞の3 積の発現媒体において、プレト u TF h 又は h u TF h を発現できるベクターを作った。 同様に、EcoR J 結構来端を有する可溶性プレト u TF h 構造遺伝子を含み、例16 a で調製した805 b p の断片を例16 b ~ f で述べた方法に促がって操作し、これら異発現媒体中可溶性プレト u TF h 又は h u TF h を発現できる発現ペクター (すなわち、プレト u TF h ー TR 又は h u TF h ー TR )を作った。

第1回で示した残益30~35、(~VNQVYT~)のナミノ 致残去配列で作られていることを示していることに注目すべきで ある。

18. 抗huTF抗体による磁集阻害の速度論

抗トロTF抗体が、トロTFの凝集開始を図客できる時間を選定するため、この阻害の時間経過を、例10で述べた図書検定性を用いて測定した。

例 7 で述べたように調製した、MAPS早離化TP8-5G9モノクローナル抗体およそ1 ng を、100 p4 HBS/TBS中、例 4 で述べたように調製した再態質化 hu TFおよそ1 ng と混合した。このように形成した程本の混合物を、37 でで、約1から60分の間の機本の時間維持し、抗 hu TF抗体を、hu TF た免疫学的に結合させ、免疫反応度物を作った。第13個で示した時間に、各混合物について、例 2 で述べたように、 hu TFの 最適活性を検定し、ついて、例 10で述べたように限害率を示した。

第13回で、このような速度論的測定の結果は、この検定で用いた抗体及び精製したカロTFの構成で、65%以上のカロTFによる凝集関始の阻害が、10分以内に起こることを示すことが分す。より高い抗カロTF抗体機度では、より退く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗トロTF抗体による、トロTPによる凝集開始配客の投与

抗体投与範囲にわたる、huTF裔集関始を顕著する本発明の抗huTF抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により 校定した。例4で調製した再覧質化huTFlngを、0.1ヵg のHBS/BSA中、例7で述べたように単難した、類々の量の

## **特表平1-503438 (27)**

TF8-5G9モノクローナル抗体と混合した。このように調整した混合物を嫁替して免疫反応重物を作り、つづいて例10で流べたように、buTFの森血括性に関する検定を行った。

そのような投与一応答検定の結果を、第14回に示し、また、このことはこの研究で用いたhuTF調度に対し、ng当り、およそ1~5ng の抗huTFでの最高値の半分の阻害を示している。

同様の役与一応答実験を、トロ丁F諏として溶解したヒト和語 を用いて行なった。

ヒトの繊維芽和胎系列CM1381 (NICMSヒューマン・ジェネチック・ミュータント・セル・レポジトリー)を、2mMグルタミン、5 %ウシ胎児活性及び抗生物質を捕った、ダルベコ体正イーグル培地(DMEM、NYH、グランドアイランド、ギブコラボラトリー)中、37でで、7%(ッ/ッ)二数化炭素空気芽囲気下で培養した。GM1381細胞を増殖し、そして収穫し、さらに30×10・個の組設のペレットを違心で調製し、一70でで凍枯した。この液格ペレットをHNパッファ(25mMペペス、140mM NaCL、pH7.0)中の15mMペータ、オクテルグルコピラノシド溶液9 maを溶解した後、HN18mlの元10分間37でに維持して、細胞を溶解した後、HN18mlを加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル抗体TP8-5G9を、第15図に示した機やの投与に対し、0.01%BSA(シグマ、R1A級)で符款した。それから各抗体策数25 μ2に、先に週間した細胞溶解数225μ2を加え、50分間 37でに保って、抗体を細胞溶解物中に存在するBuTFと免疫 反応させ、免疫反応定数を形成させた。その後、25mM CoC2。

ーシェン混合物100μ & を、50μ & のヒト因子可欠損血無及び50μ & の50μ M CaC & に添加することにより測定した。37で、1分後、相同種の血液の10倍帯駅物50μ & を因子関連として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24個のMoAb のうちの18個がパブーンはTF又は、アフリカ・ミドリザル管理報節抽出物のプロコアグラント活性を阻害した(第8表)。しかし、MoAb のいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、半又はブタのTPと、交差反応を示さなかった。すなわち、相同的因子知識の存在下、ヒト因子以欠失血炎のリカルシフィケーション時間促進能を示すTF提製物ではなかった。 依体のいずれも、正常なヒト血質での検定による、ウサギTFのコアグラント活性を示さなかった。 5 0 μ 2 を、免疫反応度物を含む溶液 5 0 μ 2 と混合し、ついで、 5 0 μ 2 のクエン酸化ヒト血漿と混合し、發類を開始させた。このようにして作った混合物を 3 7 にに維持し、血骨の熱加と、凝血形成の間の時間を測定した。効果的 h u T F 過度及び固容率を例 1 0 に述べたように計算した。

トu TF減として、ヒトG M 1 3 8 1 相助溶解物を用いた投与 - 応答図客検定からの結果を、第 1 5 図に示した。これらの結果 は、TF8-5 G 9 抗ト u TF抗体が、 s 4 当り、およそ8-1 0 n s の抗体強度で b u TFのこの相胞溶解剤の半分の図客を 起こしたことを示している。

### 20. 非ヒト組織因子とMoAbの交差反応性

組織因子を、疑題機(ラット、ラピット、子ウシ、イヌ、羊、プタ及びヒヒ)又は、組織培養細胞(アフリカミドリザル腎臓(COS)細胞)から単離した。組織又は細胞を融解し、膜をはぎ、ミンチし、組織1g当り、1mgの南アセトン中では過した。この固体をアセトンに整心し、もう5回波通し、一晩空気を増したのち、−30℃で保存した。同始温度量の16~19%を含むアセトン粉末を細かくしてから、5mmi/し足D丁を含む TBS中、5%(μ/▼)となるよう整治し、室温で1時間減した。10.000×g、20で、30分間の違心で無めたのでよりである。10.000×g、20で、30分間のようで無めた。このベレットを、TBSに無過し、−80℃に保なした。

助物TF(TF活性をもつ担組機抽出物)による抗体服害を、次のように測定した。等容量のTP(1 mx/ mx) 及びハイブリドーマ上清(TBS/BSAでの10倍条状物)を、37でで2時間インキュベートした。残存するTF活性を、そのインキュベ

第 8 表

		RIA	Fyl	917 <b>9</b> :	ブロット	阻害	¥Υ	動物
noab	アイソタイプ	(cpa)	ブロット	R.	N.B	爱血,	ч.	の阻害
TF8-3C4	1261. z	6242		±			~	
TFB-569	1:61. #	28587	•	Ŧ	+	95	57	
TF8-11012	Jg61. *		+	•	+	99	80	••
170-11012	1801. ×	29453	+	•	<u> </u>	99	82	
TF9-1F1	leGl. #	25133	•	•	+	95	83	ы.3
TF9-105	1:61. z	3872	+	+		95	76	н.3
TF9-1B7	leGl. #	28586	4			97	90	n.3
TF9-188	leGl. #	28552	•	4		98	83	n.3
TF9-1B9	leG1. #	28523	+	+		97	84	и. 3
TF9-2C4	1461, #	24435	+	+	•	97	78	n.3
TF9-2F5	1251. #	27422			•	97	79	n.3
TF9-4011	JeGl. #	25994	+	4	•	97	81	n.3
TF9-564	1:G1. #	24073	+	4	+	97	83	n.3
7F9-5B7	1 : 61. A	25819	÷	+		97	74	H. 3
TF9-5C7	IgG1, #	24543	4	+	+	. 95	72	n.3
TF9-684	1:61, x	17894	+			96	98*	n.3
TF9-664	1:51. =	24065				95	78	н.3
TF9-6C9	leGl. #	8054	+	+	+	95	47	
TF9-7E10	IgG1. #	8025	•	+	+	97	54	
TF9-8E3	1261. A	29152	+	•	+	97	76	n.3
7F9-9E1	1:61. #	18169	+	+	+	90	71	n.3
TF9-9C3	lgGl. &	30222	4	+	+	97	82	n.3
TF9-984	leGl. #	33728	+	•	+	95	82	H.3
F9-10C2	JaG1. #	28592	+	•	÷	98	71	н. з
TF9-10810	IgG1. #	24585	+	+	•	Ö	20*	
PA 100	IgG, «	1929	-	-		0	0.*	•••

- 特にことわらないかぎり、全ての結果は、ハイブリアーマ組 機将乗上律の10倍等契物を用いて得られたものである。低分 当りのカウント数 (cps)で変わされているラジオイムノアッ セイの結果は、ラクトパーオキンダーゼを使ってラベルした 1291-TPを用いている。
- 2. 遠元 (R) 又は非道元 (NR) のTFを用いて行ったウェス タンブロット。
- 3. 特製したヒトの属すFによって誘導されるヒト血法の凝結の 関客。
- 4. J82毎節に対する特異的 \*\*\*1~因子77/26 \* 結合の阻害。
- 5. 祖ヒヒ扇抽出物(B)又は溶解COS細胞(M)により誘導されるヒト血素養無限害。MoAbが60%以上の凝血活性を阻害するとき、文字がその様の場所に入れられている。

ナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Ches.)、262巻、11692(1987年)。従って、細胞表面 huTF: はノほ。複合体会合に関するMのAb の効果は、J82細胞を、抗体とプレインキュペートレ、さらに、「\*\*1-因子ソノほ』の特異的結合を定量することにより試験した。

JB2細胞を12次培養プレート中、フェア ( Fair ) 等によ って報告されているように(上述)、集密化するまで培養し、パ prof (137mm NaCa, 4mm KCa, 11mm) Lーグルコース、5mMアジ化ナトリウム、10mMへペス、 pH 7. 4 5) で洗浄し、ついで、精製したM o Ab JaG又は、 ハイブリドーマ培養上清10倍岩駅物を含むパッファA0.7g& とともに、37℃で2時間インキュペートした。塩化カルシウム 及び、「301ー因子79/ほるを各々、最終温度5mM及び1ヵM となるよう添加し、さらに37℃、2時間インキュペートした。 その後、細胞単厚を、冷パッファB(1 4 0 mM N a C & 、 0.5 がBSA、5mMトリスHCま、 pH7.45) で5回洗浄し、1 a & の 0.2 M N a O H、 1 M S D S、 1 0 m M E D T A 溶板中 で溶解し、その溶解物のガンマ線をカウントした。特異的結合は (非ラベル因子VI/VIaを100倍過剰存在下、細胞と会合する \*\*\*】因子な/な。)、非特異的結合放射活性を差し引いて浸定 した。特異的結合の阻害率は9字のパッファAと、1容の培養培 地で処理したコントロール協取に対する、M o Ab で処理したJ 82知勘という形で樹穿した。

因子別/別aがTPに結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合によるTPインターナリゼーションの可能性を はくため、J82初節を、5mMTジ化ナトリウムで代謝的に毒 吸した。細胞のアジド処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ

## 第 9 表 モノクローナル抗体TF8-509による、 様々の細胞及び組織の森血活性の回客

TF活性深 TF活性 (外型客) 抗体なし PAb100 TF8-569 245 (842) 特盟ヒト降丁ド 1569 1520 (3%) 411 (ROX) 粗糙抽出物 2059 2059 (01) 程贴受抽出物 1287 1344 (02) 159 (881) GH1381維維芽細胞(溶解化) 990 956 (2X) 143 (862) 七十里珠 (線媒化) 2893 2745 (5%) 176 (94%) J82 膀胱がん細胞 (溶解化) 882 902 (0%) 93 (89%) ウサギのトロンポプラスチン 2106 2108 (OX) 2157 (OX)

- 1. 特別したヒト届TFを、テスト前にリピロトピヒクルに再構 成した。
- 2. 右の2つの側は、指示されている特製!8Gで処理した後期 定した、ミリユニットで表かした残留TF活性の2回の平均値 が示されている。残存するTP活性の測定前、サンプルを37 セで20分間、10μg/mgの1gGとインキュペートした。 カッコ内の値は、抗体なしの両サンプル活性ユニットに対する 風害率が示されている。
- 21. 因子证辖合の研究

因子リノリョのTFへの結合は、複能性TF: リノリョ 森泉促 道複合体の集合に必要とされるので、因子リノリョのTFに対す る結合を妨げることによる、第8表に示したMo Ab のTF活性 中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子性のJ 8 2 の防肤がん細胞表面への結合はよく調べられている。フェア ( Fair ) 等、ジャー

た.

この研究の結果は、上の第8支に示されている。 TF活性を関 書する金での23個のMoAb は、因子リノは = 結合も配客した。予想されるように、TF活性を阻害しないMoAb、TF9- 〜 10m10は、因子切の結合を限害しなかった。

22. J 8 2 拇腔による因子 X = 形成の阻害

J 8 2 組設上でのh u T F: W/Wa 複合体による因子X s 形 成速度を、次の修正をした、フェア ( Fair ) 等(ジャーナル・ オブ・パイオロジカル・ケミストリー ( J. Bio)。Chem. ) 、 262巻、11692頁(1987年))により銭告された、多 次培養プレート検定法を用い 2 度定量した。細胞を、12 穴プレ ート中で培養し、J82細胞への因子VIノVIaは合の際に上ばし たように、検定開始前、種々の進度の特製した、MoAbのIsG 百分と37℃で2時間プレインキュベートした。単一の濃度の因 子は/Ⅵs(1mM)を検定で採用した。因子Xを最終濃度50 µ x / m l となるよう添加した後、5、10、15分の間隔で、 50μ2の上波を採取し、550μ2の50mMトリス・HC8、 2 2 5 m M N a C s 、 5 0 m M E D T A ( pH 8.2) の溶液中 に入れた。発色性因子Xュ基質添加後(TX州、ピューモント、 ヘレナラブ社、34mM S-2222 50gg)、速度論的分 折モジュールをつけたペックマンDU-30分光器でもD5ヵm の吸光度の増加を測定することにより、因子Xの活性を定量した。 因子リノリョ非存在下でインキュペートしたJ82細胞ト滑のS - 2 2 2 2 加水分解によるパックグランドを各測定値から差引い た。抗体処理の固者率は抗体とのプレインキュペーションなしの 和腔に対して計算した。

M · Ab TF 9 - 2 C 4 及びTF 9 - 5 B 7 による J 8 2 お地

の処理に対する阻害由線は、因子×a形成速度が、因子り結合を阻害したものと同様の抗体速度で阻害されることを示している(第17回)。非阻害的(非中和性)MoAb TF9-10HIOは18G適度10P8/akまで、凝血促進活性、因子リンリa 結合又は因子×a生成速度にほとんど影響を与えないし、また、コントロールMoAb PAb 100は全く効果がない(データ示さず)。

23. huTFhポリペプチドの因子などであっての競合的結合による。 J 8 2 神殿上での因子X活性化の阻害

当分野ではよく知られているように、篠血促激プロテアーゼカ スケードの細胞活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる様々の病 気と関連している。一般に、森血促進プロテアーゼカスケードは、 膜レセプター及び基本的共因子、組織因子(TF)に対する因子 VI/VI×の高い親和性による発見により、細胞表面で開始する。 ・ TF及び因子はノリョの二分子森血促造符合体(TPェリノリョ) は、最終的にトロンピン形成及びフィブリンの折出につながる限 定したタンパク質分別による因子X及び以の活性化を起こす。さ らに、凝血におけるTFの役割、TFによる凝集プロテアーゼカ スケードの開始は、接種性血管内疑固及びトロンポジェネシスと 関連する。ニーメツ ( Kienetz )等、ブラッド ( Blood ) 4 2 巻、 4 7 頁(1 9 7 3 年)及びベビラクア ( Bevilocqua ) 岑、ジャ ーナル・オブ・キクスペリメンタル・メディシン( J. Exp. Med.) 、 160분、618頁(1984年)。丁戸は、炎症性仲介物に対 する応答及び細胞性免疫応答で、単球及び内皮細胞の表面で発現 する重要なエフェクター分子である。

本発明のhuTFhポリペプチドが、因子ロノVIコに結合し、 それにより、因子Xを哲性化することができる、TF:VIノVIコ

第10表 . boJFポリペプチドを用いたJ82 相腔に関するX活性化の阻害

	•
h u T F ポリペプチド	光学密度'
PBS	0. 9 6 0 ± 0. 0 8 3
因チⅥ/Ⅵsなし	0.005±0.001
p 1 = 1 8	1. 0 0 7 ± 0. 0 8 7
p 1 - 3 0	1.098 ± 0.028
p 1 1 - 2 8	0.687±0.071
p 2 4 - 3 5	0. 4 7 7 ± 0. 0 1 7
p 2 · 6 - 4 9	0. 4 3 7 ± 0. 0 2 0
p 4 0 - 7 1	0. 8 1 4 ± 0. 8 5 3
p 7 2 - 1 0 4	0.781±0.047
P 9 4 - 1 2 3	0. 8 1 8 ± 0. 0 5 5
p 1 2 1 - 1 5 5	0. 8 8 9 ± 0. 0 6 7
p 1 4 4 - 1 5 9	0. 5 0 7 ± 0. 0 5 3
p 1 4 6 - 1 6 7	$0.004 \pm 0.001$
P 1 5 7 - 1 6 9	0. 3 8 9 ± 0. 0 3 5
p 1 6 1 - 1 9 0	0. 8 0 0 = 0. 0 2 3
p 1 9 0 - 2 0 9	0. 6 2 5 ± 0. 0 3 1
p 2 0 4 - 2 2 5	0. 7 1 5 $\pm$ 0. 0 4 2
p 2 4 4 - 2 5 3	0. 6 1 9 ± 0. 0 4 7

もし、光学温度(O.D.) か約0.500以下なら、因子Xの活性化の阻害は有意であると考えた。

本研究の結果は、トロTFトポリペプチFp24-35、p26-49、p144-159、p146-167及びp157-169は、因子リノリュに結合し、因子Xを活性化できる、TFェリノリュ複合体の形成を図書することを示している。これらの 複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS中、100μMのカッTFボリペプチド類似物を含む溶 被 50マイクロリットル (μ l) を、95次平底ボリスチレン検 定プレートの各ウェル96個に入れ、ついてその各ウェルに、辨 3で述べたように単離した、TBS中1 mMの速度に調整した因子リノリッを含む溶液 25μ lを加え、さらに、TBS中20mm の塩化カルシウム 25μ lを加え、その混合物を 30分間 室温に 維持した。

ヒト膀胱がん細胞 J 8 2 細胞を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC HTB1; MD州、ロックヒル)から入手し、参考としてここに組込まれているフェア (Fair)等の方法 (ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー)、262 巻、11692-11698頁 (1987年))に従って独美/

50 μ 8 の T B S に 5 × 10 4 個の J 8 2 相附を懸滅し、上述の独特を行った後、ポリスチレン校定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア ( Fair ) 等の報告のように (上述) 早難した、T B S 中 100 m M の機度の因子 X 2 5 μ 8 及び、X a 発色器質 S ー 2 2 2 2 () ミノ a 8 T B S) 5 0 μ 8 を加え 混合し、その混合物を 2 分間室温に維持して、発色反応座物を含む溶液とした。

生成した発色産物量を、V-max 9 6 次スペクトロホトメータ (カリホルニア、マウンテン・ビュー、モレキュラー・デバイス 社) を用い、405ナノメーター (nm) での光学密度 (0.D.) を滅定して定量した。ポリペプチドの代りに丁BSを用いるか、又は、因子は無添加のコントロールも滅定し最高及び最低OD値を決定した。これら限客の滅定結果を第10表に示す。

結果は、本発明のカロTF結合部位ポリペプチF貫似物が凝集を 阻害するのに用いることができることを示している。

24. 抗カロTFb MoAb による凝集の生体内での阻害

しばしば、グラム降性和菌による腐敗症は、最終的に死に至ら しめるショック状態を起こす。このヘモスタチスシステムの乱れ は、このショック状態の展開と密接に関係している。テイラー (Taylor) 等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション (J. Clin. Invest.) 79巻、918~825頁 (1987年))は、外的に加えられた活性化した、タンパク質 C、天然の抗毒血酵素、は、凝集応答及びヒヒにおけるL Dees の大調菌濃度の致命的効果を妨害する。

MoAb 投与及び30分間の平衡化の後、各動物は、LDioo

の大陽雷の投与を受けた(約10<sup>4.4</sup>個、投与後約3~16時間で 敗血性ショックのため死をもたらす量である)。大陽届は2時間 に波り往入により投与した。この研究結果を第11度に示す。

第11表 ヒヒの敗血性ショックによる致死の生体内における阻止

グループ	Hoab	投与	秦血'	太 降 译 入	死
1. 7>10-3	TF9-587	500	Normal	Ro	No
Ⅱ. 3>}0-3	BB*	500	Normal	Yes	Yes
1. A H	TF9-517	500	Normal	Yes	Po
	TF9-587	150	Norma 1	Yes	¥o

- 1. 血圧、凝集活性化及びフィブリン分解産物を含む種々のヘモスタチスパラメータは、MoAb投与後、大瑪爾柱入前に測定した。
- HBは、TF9-5B?と同じ額及び亜鎖のMoAbであるか、無関係の抗原と免疫反応を起こす。

系11支にみられるとおり、MoAb TF9-5B7を受けた ヒヒはLD1...の大路面の投与に対しても生存しつづけた。HoAb 150p8/W及び500p8/Wの両投与で保護された。さら に、コアグロバシーと関係する、顕著な低血圧、破損カスケード 活性化およびフィブリンの分解は、MoAb TF9-5B7を受 けた動物で若しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎮としての、 5 8 k Da h u T P へ テロダイマー経緯の特殊

免疫駅和性単離したTPをさらにウェスタン・ブロット分析で 特性をはべ、58kD huTPへテロダイマーの成分、すなわち、 例4で述べた47kDs及び125kDsタンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

従って、現在、例もで述べられている58kDa ヘテロダイマーの125kDa 経額成分は、ヘモグロピンのアルファ額であり、47kDa hロTアタンパク質との会合は、hロTア単型操作のアーテファクトであると考えられている。

例1~25の結果のまとめと計論

2つの異なる細胞融合体由来の、ヒト脳TFに対する、24種のMoAb ライブラリーについて報じられている。各MoAb の免疫特異性は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。ほとんどのMoAb は、全ての3条件下、ヒトの本来のTF及び変性TFと反応した。MoAb の1つ、TF8-5G9は、TFタンパク質のルーチンな精製にうまく使用することができる。それは組織抽出物由来のTF括性を吸着し、ミリグラム量の精製ヒトTFを一定して与える。

MoAbの1つ以外の全ては、精製したヒト脳TFの機能活性を強く中和する。いくつかのNoAbに、ヒヒ及びサルのTFと交換反応をすることが分っているが、相例的因子可の存在下、ラット、ウサギ、子クシ、イヌ、羊、又はブタのトロンポプラスチンにより開始した因子で欠損とト血性の凝集を、どの抗体も限等しなかった。さらに、ウサギ局トロンポプラスチンによる正常なヒト血性の凝集開始は、どの抗体によっても超等を受けず、このことは、ヒトTF凝血活性の阻害は、因子でブリッを含む、可溶性血性凝血性の大力ではないという結論を支持する。

抗TFによるTF森血活性の阻害に対する最も可解な原因は、 因子リンリッ結合のブロックである。予想されるとおり、全部で 例6 c で速べたように行った、ウェスタンプロット分析を、電気味動するサンプルとして、例9 で述べたように調製した、免疫 関和性により早難した A u T F、特製したヒトへモグロビン、又は、分子量極準を用いて行った。指示されているところではピスルフィド結合の選元のため、サンプルパッファの中に50 m M ジ チオスレイトールを含めた。ウェスタンプロットを、非免疫化ウサギ1 g G、従来の方法で調製したウサギ抗 B u T F I g G 又は、ダコ ( Daco ) (カリホルニア、サンタバーパラ) 社から入手したウサギ抗ヒトへモグロビン1 g G を用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つの1 g G 調製物は、例7 で述べたように単類した M A P S - B である。

上で述べたウェスタンプロット分析の結果は、第18回に示した。流huTF ISGは、運元型huTFの47kDaのパンドとのみ免疫反応を起こし、125kDaのパンドとは反応しなかったが(パネルA、レーン3)、一方、同ISGは、非運元型huTFの58kDa及び47 kDaの阿パンドと免疫反応を起こした(パネルA、レーン4)。これらの結果は、58kDaのプログイマーの47kDa放分としてのhuTFの同定と一致している。 抓へモグロビンISGは、非運元型huTFサンプル中の58kDaパンドとのみ免疫反応を起こし、47kDaのモノマーとは反応しなかった(パネルB、レーン4)。しかし、流へモグロビンISGは、運元型のbuTFサンプル中の125kDaパンドと免疫反応し(パネルB、レーン3)また、125kDaの特践したヒトへモグロビン・タンパク質と免疫反応した(パネルB、レーン2)。 非免疫ウサギISGとの反応はなかった。

上記の結果は、非運元型カロTFの58kDs の分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した47kDs カロTFから

23個の抗凝血(中和性)M。Ab は、TFの基本的レセプター 機能と一致して、J82補酸への因子VI/VIsの特異的結合を妨 ぐ。さらに、このことは、因子VI結合及び、因子Xs形成速度の 限客のハーフ・マキシマルが同じIsG機度のときに起こる、送 択した特質M。Ab の投与演定においても実証される。

ヒトTFに対するMoAb は、最近、カーソン( Carson )等 (ブラッド ( Blood )、7 B 地、4 9 B 頁 (1 9 8 7 年) ) によ り、これを直接は缺したのではないが、因子リノモュ結合の妨害 によることは明白に、TF括性を阻害するものであると報じられ た。24個のここで述べられているMoAb のうちの23個が、 TF活性を強く中和するという知見は注目に値する。機のヒト凝 血タンパク質に対するM o Ab を用いた当出職者の研究室で行っ た実験は、少数の割合のものが機能活性を中和するというもので ある。基本的TPとの交差反応性が合む、反応性が各々異なるこ とから、ハイブリドーマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。 さらに、遺行中のエピトープマッピング研究は、この種のMoAb に少なくとも3つの別々の非難合抗体結合部位が確認されること を示している。それゆえ、TFに対するMoAb を中和する大郎 分のものは、機能にも関係するわずかな免疫的に優勢なエピトー プによるものでもないらしい;事実、ホブ ( Hopp ) 等により (モレキュラー・イムノロジー( Hol. Imaugol.)2 0 巻、 4 8 3 頁(1983年))TFのアミノ数配列は、多くの抗原活定基を 含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、そんなに多くの抗TF M o A b が因子などり a 結合をブロックするのかを部分的に説明している。 TFは、 cDNAクローニングにより、グルコシル化を除いて、 2 5 k D a の知題外ドメインをもつことが予想されている。それ

### 持表平1-503438(31)

ゆえ抗体及び因子切/りョ分子は、より小さいTFの知胞外ドメインへの結合に立体障害を示しことになる。この立体障害仮設は、TF上の炭化水素質がおそらく機能には必要ないことから(ナカムラ( Bakamura )、トロンボへモスタチス( Trop. Resost. )58巻、135頁(1987年))、コンカナバリーノ人はTF活性を阻害する(ピトリック ( Pitlick ) ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション ( J. Clin. Invest. ) 55巻、175頁(1975年))という観察と一致する。

それは、種々の細胞及び組織により発現した因子性依存凝血活性は、同様の機能をもつ、1つ以上の分子種に再因するということに、いくらか関連している。しかし、MoAb TF8-5G9は短脳及び胎盤抽出物及び溶解した総雑芽細胞、腱脱かん細胞及び末梢単核細胞の凝血活性を定量的に阻害する。完全ではないが、これらの結果は、現にTFに新因する細胞性凝血活性は、同一ではないときも抗原的に関連しているという結論を支持している。このことは、TFに対する単一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

最近、敗血性ショックの政死効果は、凝血プロテアーゼカスケードにおいて、中間段階での役割を果している抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質でを住入することにより、ヒヒにおいて助ぐことができることが示されている。本研究は、TF活性を選客するMoAbは、凝血プロテアーゼカスケードの関始のプロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と退席関連している、血疾凝血因子の消費を妨ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で述べた5 8kD。型のhaTFは47kD。のTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまた部分的アミノ酸配列により、

抗丁F抗体との反応で観察された。5 8kDa パンドの一部を含む、これらマイナーな分子機は、丁Fと他の未同定タンパク質問で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の態徴及び例を含む先の明報は、本発明の説明を意図した ものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、 修正が、本発明の精神や範囲を逸融することなく行うことができる。 へモグロビンのアルファ镇と同定されている、およそ 1 2 5 k D a のポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。 5 8 k D a のペンドは、 早間の途中で形成されているらしいので、 5 8 k D a のペンドは、 天然の細胞性 T F のヘテロダイマー型であるという以前の推案は 誤りであるだろう。

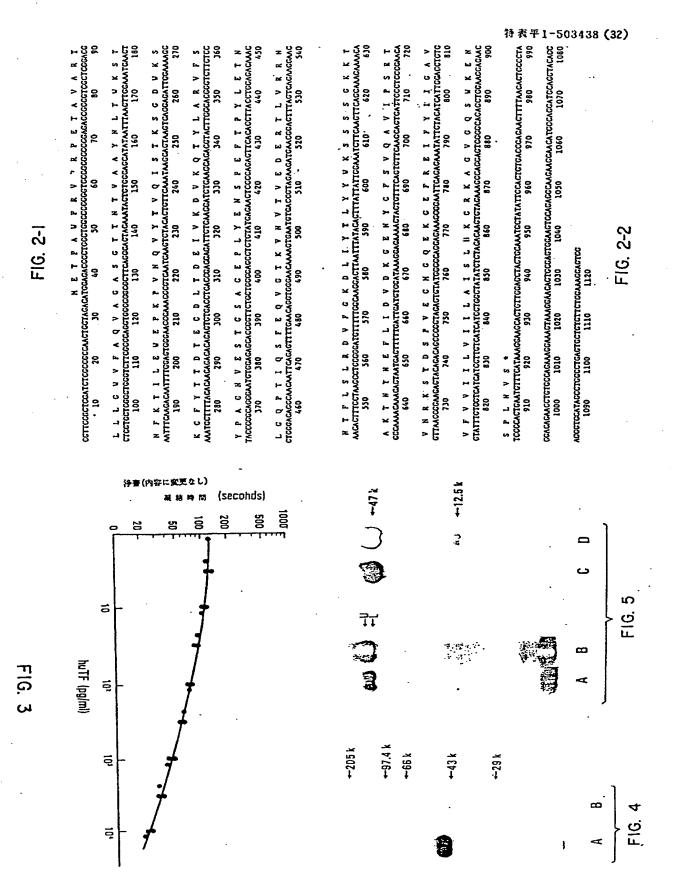
ヘモグロビンのアルファ鎮は、1つのシステインをもち、また TPは、 cDNAから、その細胞質ドメインに1つのシステイン を有することが予想される。またTFは、細胞外ドメインには4 個のシステインをもつが、TF機能が道元により失なわれること から、少なくとも2つが銭内ジスルフィド結合に使われているは ずである。TFの毎胞質Fメイン中の1つのシステインは、ほと んどの細胞質ゾルタンパク質中のシスティンのように、選元型で 徴持されているだろう。この(TPの他のシステインは、ありそ うもない)システインは、毎節溶解後、混合ジスルフィド形成の ため容易にアクセスでき、そして、単點換作間での酸化で、TF の招跑質及びへモグロビンのシステイン間でジスルフィア競会が 形成すると提唱される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明 らかに時間依存性があり、脳アセトン観末由来の丁Fの昇面活性 刑抽出と、免疫観和性マトリックスへの結合との間の時間を小さ くすることが、得られるヘテロダイマーTP量を減少させる観客 を支持する。後定される96kD。のTFダイマーも、単離の際 同様のメカニズムで形成するであろう。

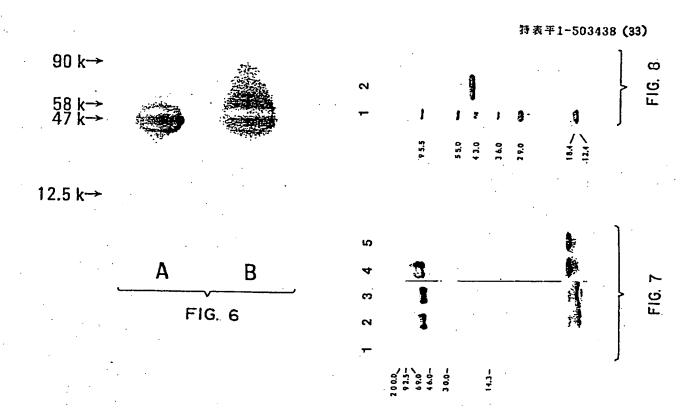
抗ヘモグロビン抗体カラムは、3つの5 8 k D a のヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫觀和性で特製したTF調製物中に観察できる高分子量機全てを定量的に放くことはなかった。
4 7 k D a 以上の分子量をもつ他の底球量のマイナーバンドは、

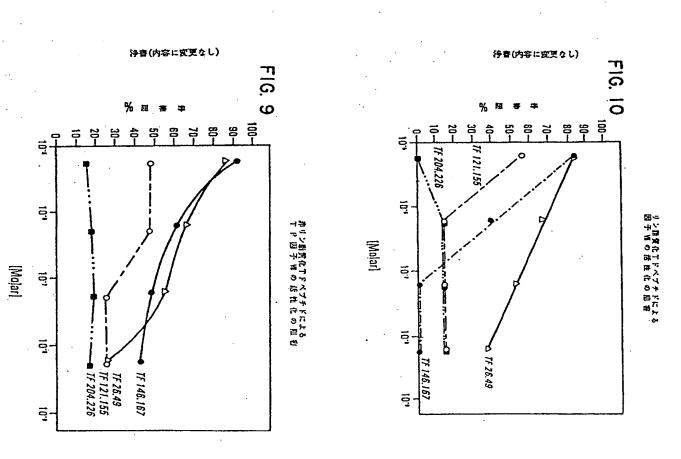
ме		-20 Etavartlll	-10 GWVFAQVAGA
10	20	. 30	40
SGTTNTVAAY	nltwxstnpk	TILEWEPKPV	NOVYTVQIST
50	60	70	80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIAKDAKÕ1	YLARVPSYPA
90	100	110	120
GNVESTGSAG	<b>EPLYENSPEP</b>	TPYLETNLGQ	
. 130	140	150	160
TXVNVTVEDE		LSLRDVFGKD	LIYTLYYWKS
170	180	. 190	. 200
SSSGKKTAKT		KGENYCFSVQ	
. 210	220	230	2.4
	GQEXGEFREI		240 VIILVIILAI
250	260		

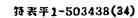
FIG. I

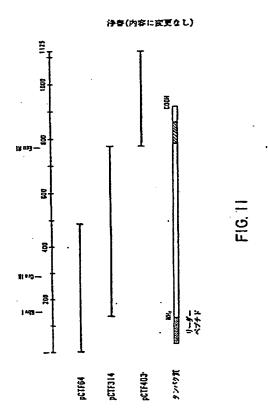
**ELEKCREAGY GOSWEENSPL NVS** 

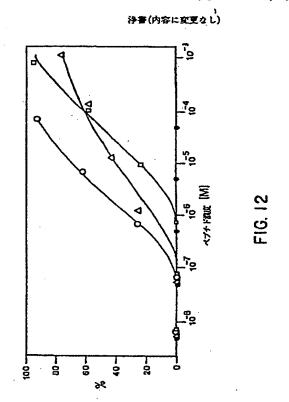


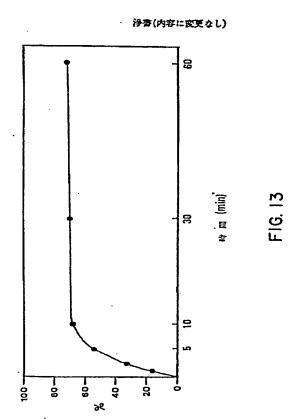


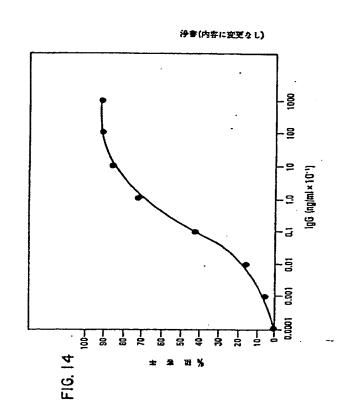


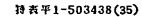


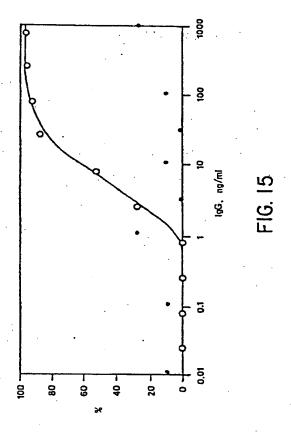


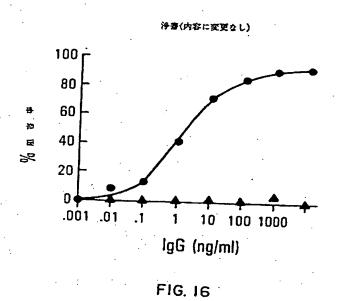


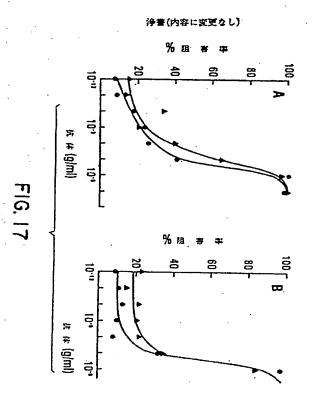


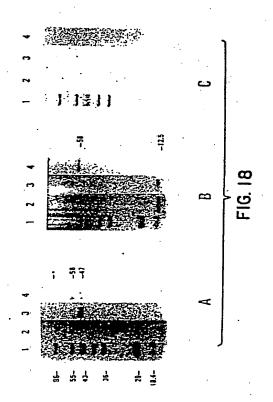












## 持表平1-503438 (36)

# 乎 號 穑 正 吾 (方式)

**1.** 8. 31

平成 年 月 日

符許庁長官

吉田文 数 第

1.事件の表示

PCT/US88/00998

2.発明の名称

ヒトの組織因子に関連するDNA 断片・ポリペプチド及び抗体

3.補正をする者

事件との関係 出 職 人

名 称 スクリップス クリニック アンド リサーチ ファウンデーション

4.代 理 人

氏 名 (5995) 弁理士 中 村

社(

5. 補正命令の日付

平成1年8月22日

6.補正の対象

明知書及び請求の範囲の翻訳文 図面の翻訳文(第3、9、10、 11、12、13、14、16、17図)

7.補正の内容 別紙のとおり

明細書、請求の範囲の翻訳文及び図面の翻訳文(第3、9、10、11、12、13、14、16、17図) 神 片

方 式 ①



#### 冠 忌 瑞 孝 磐 失

LCARAMTERIOR DE SERVETT RATTIN DE SOUTH UNIVERSE DE SERVET DES TRANSPORTE DE SERVET DE
COLUMNIA CONTROL STATES AND CONTROL CONTROL (1970)
Carried barrier   Carrier   Carrier
Construct horse:  C12/E5; C257, 88.70,77, 85.727.1-172.3,243,223,227  C.S. 22/55,95-105: 235/222: 335/224-227, 315,345,536/27,513,8.5,11,12  Baronando horse parameter in the control of t
C.24/E3; C.25/7,88.70,72.92.272.1-72.3,221,223,3207  C.5. 51.472.5,12-15.322: 336.724-237,321,223,3207  December before seement the content of the content o
C.S. 11472.5.1225.3221 135.724-137, 3E1, 3E7, 525.77, 525.E.S., 11.12  Description between the two the two the two
OF Files 1967-1988  M. DOCUMENT Examples of MALVARY S  Control 1967-1988  M. DOCUMENT Examples of MALVARY S  Control 1967-1988  M. A. GURA ET AL, "Affinity purification and of human rissue factor: Interaction and of human rissue factor: Interaction and detergant micelles", Proceedings of the Kational Academy of Sciences  USA, Volume 33, pages 299-202, published January 1988 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Manhington, D.C., UZA). See entire document.  Y G.J. BROZE, JR. ET AL, "Purification 1-2% of human brain tissue factor", The and Journal of Biological Chesistry, While Marican Society of Bio
M. NOTIMETER CREATERING TO COMMENT AND CONTROL OF COMMENT AND COMM
Y A. GURA TO PART ALL, "Affinity purification of human tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in Cetergan alceller, proceedings of the National Academy of Sciences of the National Academy of Sciences of the National Academy of Sciences of the United Academy of Science of the United States of America (Weshington, D.C., USA). See entire document.  Y G.J. ENGIL, TR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The And Journal of Biological Chemistry, Volume 260, pages 10917-1092D, published 13 September 1985 by the American Society of Biological Chemistry, (A2-5s) by the American Society of Biological Chemistry, (Baltisone, MD, USA).  See entire document.
A. GUEN IT AL, "Affinity purification of human tissue factor: Interaction of human tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in determined to the control of the control
of human tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in determined the control of determined the control of determined the control of the National Academy of Sciences USA, Volume 83, pages 299-302, published January 1988 by the Pational Academy of Sciences USA). Volume 83, pages 299-302, published January 1988 by the Pational Academy of Sciences USA). Face entire document.  Y  G.J. BROIE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The Journal of Biological Charletty, 42-5# Volume 250, pages 10937-10920, published 13 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 13 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the Amer
of human tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in determined the control of determined the control of determined the control of the National Academy of Sciences USA, Volume 83, pages 299-302, published January 1988 by the Pational Academy of Sciences USA). Volume 83, pages 299-302, published January 1988 by the Pational Academy of Sciences USA). Face entire document.  Y  G.J. BROIE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The Journal of Biological Charletty, 42-5# Volume 250, pages 10937-10920, published 13 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 13 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Charlette, Company 10937-10920, published 15 September 1985 by the Amer
Cetergent micelles", Proceedings of the Kational Academy of Sciences USA, Volume BJ, pages 299-302, published January 1986 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington, D.C., USA). See entire document.  Y G.J. RNOIZ, JR. ET AL, "purification of human brain tissue factor", The Journal of Biological Chemistry, Volume 250, pages 10917-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Daltisons, JD, USA). See entire document.
of the National Academy of Sciences USA, Volume BJ, pages 289-302, published January 1986 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Mashington, D.C., UZA). See entire document.  Y G.J. BROZE, JR. ET AL, "Purification 1-2% of human brain tissue tactor", The and Journal of Biological Chesistry, White Company of Science Chesistry, Debut School of Biological Chesistry, Debut School of Science Chesistry, Debut Science Chesistry, Debut School of Science Chesistry, Debut School of Science Chesistry, Debut Science Ch
USA. Volume 83, pages 299-202, published January 1986 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Mashington, D.C., USA). See entire document.  Y G.J. ROLL, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The Ann Journal of Biological Chemistry, Volume 250, pages 1037-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Daltisons, JD, USA). See entire document,  ** Administration of the Community of the Communit
published January 1988 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Mashington, D.C., Utah). Ese entire document.  Y G.J. BROZE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue tactor", The and Journal of Biological Chesistry, 42-58 by the American Society of Biological Chesistry, by the American Society of Biological Chesistra, Inc., Waverly Press (Paltimore, MD, USA).  See entire document,
States of America (Washington, D.C., UgA). See entire document.  Y G.J. BROIE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor". The and Journal of Biological Chemistry, 42-5s Volume 250, pages 10917-10920, published 15 September 1985 December 1985
VEA). See entire document.  Y G.J. BROIE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The Journal of Biological Chemistry, Volume 260, pages 10917-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chemists, Inc., Neverly Press (Baltisone, MD, USA).  See entire document.  **Measurements of the common of
G.J. BROIE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor". The sho Journal of Biological themistry, 42-5# Volume 250, pages 10937-10920, published 13 September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American Society of Biological Control of the September 1985 by the American September 1985 by the America
of human brain tissue factor", The And Journal of Biological Chanistry, 42-5# Volume 250, pages 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chanistra Inc. Whenly Press 10841 by The American Society of Biological Chanistra Inc. Whenly Press 10841 by The American Society of Biological Chanistra Inc. Whenly Press 10841 by The American Inc. Whenly Press 20841 by The American Inc. The American
Volume 280, pages 10937-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chesists, Inc., Waverly Press (Daltimore, MD, USA). See entire document.  **Manual Housean Processing of the plants of the published and the publishe
by the American Society of Biological Chesists, Inc., Whverly Press (Baltimore, MD, USA).  See entire document.  * because increase press into displayment and  * designment of any press into any press in any
* hereas (processor to come processor) to "" been approved place to discussion to a special place (loss of the job public of the job publi
See entire document,  - lama move P and passeng 1 to 1 t
Section 1 Sections 1 and 1 section 2 and 1
"A" deplaces against any pages along of the section
"A" deplaces against any pages along of the section
"A" deplaces and may be present these of the section of the sectio
"A" deplaces and may be present these of the section of the sectio
The control participation of the participation of the control of t
The polyment which the tends to indeed by indeed the money in money of freedom than the polyment in the control of the control
models of Selection Pro- Deliverable made of models of post-only of pro-mode represent the pro-
the state of the same of
Opposition of the seas perioderial two ten drafts in. Section 20 Control of Labor 20 C
Miles and seek in 1994 Canada. Load South PT.  2. Set Land what the Land South Front South PT.  4. See Land American Section 2014 South South PT.  4. See Land
IV. EERTHEATION
Som or the Amen Commence to the International Sector. Date of Harris 64 Are minutes and Sector Sector.
22 SEEZ 1985 0 9 AUG 1989
better to be a second
TOURS STATE STATE AND STAT

	PROPERTIES CONTINUES FROM THE SECONS SHEET	
X.P Y.P	I.M. SCARPATI ET AL, "Ruman tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the game", Bio- chemistry, Volume 26, pages 5214- 5238, publishes 25 August 1987 of the American Chemical Society (Columbus, Onio USA). See entire socument.	1,11-10 and 17 2-10,15 16, 10-38, and 42-50
j		
	PVATIBUS WHIPS CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNBEARCHABLE *	
*****	, betsee the color to colors to be the last of the colors of the colors of	, and the second
ci ci p	aim 39 recites "an antibody composition, aim 22" while claim 22 is not directed to sim 40 depends from claim 39. Claim 42 obyseptice of claim 15" while claim 15 i Duyseptice of claim 15" while claim 15 is associated.	according to o an antibody. recites a s directed to
21 01 20 20 20 3.[] Comm	sim 39 recites "an antibody composition, sim 22" while claim 22 is not directed to sim 40 depends from claim 39. Claim 42 olypeptide of claim 15" while claim 15 i DNA. Bence, each of the claims 39-41 is searchable.	according to o an antibody, recites a directed to incomplete and
cl cl p un rcin	aim 39 recites "an antihody composition, aim 22" while claim 22 is not directed aim 40 depends from claim 39. Claim 41 obly-eptics of claim 15" while claim 15 is DNA. Benca, each of the claim 39-41 is esarchable.	according to o an antibody, recites a directed to incomplete and
el CI *p s un *CIA v. CS sessi Tree bereau I. Cls II. Cl	aim 39 recites "an antibody composition, im 22" while claim 22 is not directed to sim 40 depends from claim 39. Claim 42 olypeptide of claim 15" while claim 15 in DNA. Bence, each of the claims 39-41 is searchable.	according to 0 an antibody. recites a 8 directed to incomplete and
I Classific Clas	sim 39 recites "an antibody composition, aim 22's public claim 22 is not directed aim 40 depends from claim 22 is not directed aim 40 depends from claim 39. Claim 41 obypeptice of claim 15° while claim 15 DNA. Bence, such of the claims 19-41 is searchable.  ***TOTAL STATE OF THE STATE OF TH	according to o an antibody, recite a b directed to incomplete and
C1 C1 C1 P e n C1	sim 39 recitos "an antibody composition, aim 22° while claim 22 is not directed aim 40 depends from claim 22 is not directed aim 40 depends from claim 39. Claim 41 olypeptide of claim 15° while claim 15 DNA. Bence, such of the claims 39-41 is searchable.  ***The composition of the claims 39-41 is searchable.  ***The claim 19 of the claims 39-41 is searchable.  ***The claim 20 of the claims 39-42 is searchable.  ***The claim 20 of the claims 39-43 is searchable.  ***The claim 20 of the claims 39-43 is searchable.  ***The claim 20 of the claim 30 of the claims 30 of the claim 30 of the	according to o an antibody, recites a directed to incomplete and newspaper processor 34, 14, 17
C1 C	aim 39 recitos "an antibody composition, aim 32° while claim 22 is not directed at min 22 is not directed at min 40 depends from claim 22 is not directed at min 40 depends from claim 39. Claim 41 objective of claim 15° while claim 31 DNA. Bence, such of the claim 39-41 is nearchable.  ***The claim 20 objective of the claim 39-41 is nearchable.  ***The claim 39 objective of the claim 39-41 is nearchable.  ***The claim 30 objective of the claim 39-41 is nearchable.  ***The claim 30 objective of the claim 39-41 is nearchable.  ***The claim 30 objective of the claim 30 objective objective of the claim 30 objective objective of the claim 30 objective objective of the claim 30 objective of the claim 30 objective of t	according to o an antibody, recites a directed to incomplete and newspaper processor 34, 14, 17

A. SOCUMENTS CONSIDER TO BE RELIVANT (CONTINUED FROM THE SECOND DIEST)		
<del>~ .</del>	Copen of Detained, and referred, when provided of the selected hospital	Propert to Clark
:		i 7-3¤
١,	of a CDNA clone for bovine tissue	1-3s
		42-54
	Volume 45, page 1639, abstract no.	48-24
	927, published May 1986 by The	
	Paderation of American Sociation	
	for Experimental Riology .	
	(Bethesda, MD, UEA).	
	See entire document.	
<u>, p</u> :	E.H. SCARPATI ET AL, "Ruman tiesue	12,22-44
. T	iactors cDNA cloning, primary	and 17
į	structure, and chronosome	2-10,13
	localization", Pederation,	16,46-
	localization", Federation, Proceedings, Voluma 48, page 2242 abstract no. 1846, published	: 30 400
:	abstract no. 1846, published	: 42-56
	1 May 1987 by The Federation of	f
	American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA).	
:	See entire document.	;
!	T. H. MODELTEETY PO AL PROLONIA	1-5,11-
<u>. P</u> i	closing of the cDMA for human	13 ano
	tissue factor. " Federation	17
:	closing of the cD9A for human timese factor, Federation Proceedings, Volume 46, page 716,	6-40-
i	abstract no. 2338, published 1 May 1987 by The Pedaration	6-10, 14-16, 10-30
	1 May 1987 by The Pederation	10-30
	of American Societies for	· and
		. , 43-58
:	MD, USA), See entire document,	į.
:	S.D. CARSON ET AL. Monoclonal	: 1~3b
	antibodies against bovins tissue	iano
:	factor, which block interaction	j 42-5#
	with factor VIIa, Blood, Volume 66, pages 192-158, published	:
;	Volume to, pages 152-158, published	•
!	July 1985 by the American Society of Bemetology, Grune & Stratton, Inc.	i
	(Orlando, Fla., USA). See especially	i
	pages 152-155.	•
		•
<del>;</del>	J.H. HORRISSEY ET AL. 'Molecular	. 1-5,
	cloning of the cDNA for tiesue	. 113
	factor, the cellular receptor for the initiation of the	<u>● nq 27</u>
	tos the initiation of the	6-10.
	cougulation protesse cascade*,	44-16
	Cell, Volume 50, pages 129-135, published 3 July 1987 by Cell	14-34,
	Press (Cambridge, Mass., USA).	ADG .
	Fresh (Cambridge, Mass., USA).	43->>

## PCT/USEE/CC598

	CONCERNALD TO BE SELEVANT PERSONNELLE FROM THE SECOND SHEE	
Consequen '		
¥	R.H. AEBERSOLD ET AL.	21-3
•	"Electroblotting onto activated	42-40
٠.	glass', The Journal or Biological	ADO
	Chemistry, Volume 261, pages	52-00
	4229-4238, published 25 March 1906	
	4229-4238, profitmen as /=====	•
	by The American Society of	
	Biological Chemists, Inc.,	
	Meverly Press (Baltimore, MD, USA).	
	See especially page 4229.	
Y, P	Chemical Abstracts, Volume 107,	1-36
4.5	Sumber 17, issued 26 October 1987	200
	(Columbus, Ohio, USA), 5.D. CARSON	42-50
-	Ef. AL, "An inhibitory monoclonal	
	antibody against human tissue	
	SULIDOGA SASTURE URWEN CTARGE	
	factor", see page 539,	
	the Abstract No. 152425h, Blood	
	1987, 70(2), 490-3(Eng.).	
	Chemical Apetracts, Volume 108.	1,22-44
<del>X:3</del>	Bumber 9, issued 29 February 1989	anc 17
¥,7	(Columbus, Chio, USA), K.L. FISHER	20,
	IT AL , "Cloning and expression	1>.16
-	of human tissue factor cDNA", see	10-30
	Of BODEN CIDERO INCIDE CHAY . see	AGE
	pages 195-196, the Abstract So.	42-20
	70091c, Thromb. Res. 19h7, 48(1),	42-30
	89-99(Eng.).	
Y	A. HINNER ET AL. Transformation	2-3e and
	of years, Proceedings of the	42->-
	National Academy of Sciences	
	USA, Volume 73, pages 1925-1933,	
	published April 1978 by the	
	Pational Academy of Sciences of the	
	AFFIGURE VERGRAN OF SCHOOL OF THE	
	United States of America (Washington	
	D.C., USA). See especially paye	
	1929	
¥	M. HOUGHTON ET AL. "The amino-terminal	1-30
•	sequence of human fibroblast interferon	ang
	as deduced from reverse transcripts	42-50
	obtained using synthetic oligonucleotine	
	DEFENDE SAID SUCCESS OF ACCURATION	
	primers", Budleic Acids Research Volume B. Mumber 9. pages 1913-1931,	
	VOLUME B, MUMDER S, PROPE APAGE TIME	
	published May 1960 by IRL Press Limited	
	(Oxford, England). See page 1913.	
	•	

篡	1	育	O	綷	去

⑤Int. Cl.	4	缺別記号	庁内整理番号
C 07 K	7/08 7/10 13/00		8318-4H 8318-4H 8318-4H
C 12 N C 12 P G 01 N	5/00 21/02 33/53		B-8515-4B 6712-4B D-7906-2G
//(C 12 P C 12 R C 07 K	33/577 21/02 1:91) 99:00		L -7906-2G B -7906-2G

優先権主張

図1987年6月25日匈米国(US)⑩067,103

· 匈1988年3月9日匈米国(US)匈165,939

個発明 者

モーリジー ジエイムズ エイ

アメリカ合衆国 カリフオルニア州 92122 サン デイエゴ カ

チ

ミノ キオスコ 7955

特許法第17条第1項又は第17条の2の規定 による補正の掲載

昭和63年特許願第50355号(特表平 1-503438号、平成 1年11月22日発行公表特許公報)については特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正があったので下配のとおり掲載する。

Int.Cl	Int.Cl.		庁内整理番号
C12N	15/09	ZNA	
C07K	7/06		B318-4H
	7/08		8318-4H
	14/435		8318-4H
	16/18		8318-4H
C12N	<b>5/10</b>		
C12P	21/02		C-9282-4B
-	21/08		9161-4B
// A61K	39/395		N-9284-4C
G0 1N	33/53		L-7055-2J
			D-7055-2J
	33/577		7055-2J

(続きあり)

手 続 補 正 1

1.3.28 平成 年 月

特許庁長官 高島 単 股

1.事件の表示 昭和83年特許服第503555号

2.発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

3.補正をする者

事件との関係 出 騎 人

名 林 スクリップス クリニック アンド リサーチ

4.代 琪 人

住 所 東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号

氏 名 (5995) 弁理士 中 村

5.補正命令の日付 自 発

6. (本補正により請求の範囲に記載された請求項の散は合計「5 1」 となりました。)

7. 補正の対象

明知書および請求の範囲の指

8. 補正の内容



李安 (19)

## 平成 7.12.20 発行

Int.Cl.	識別 記号	庁内整理番号	
		A-9281-4B C12N 15/00 -ZNA B-7729-4B C12N 5/00	
	·		
		· .	

- 1. 請求の範囲を別紙の通り補正する。
- 2 明練者 6 4 頁 7 行の「BLOTTO」の後、『PBSにおける、5 % m/n 非脂肪 乾燥ミルク、0.01%アンチフォームA (シグマ銀)、及び0.0001%マー チオレート (merthlolate))』を押入する。
- 3. 同88頁18~14行の「TF8-5G9……TF8-5G9」を「TF 85G9、TF8-5G9及びTF8 5G9」と袖正する。
- 4. 岡89頁19行の「8a」を『2A』と補正する。
- 5. 両89頁20行の「8」を「2A』と補正する。
- 6. 同70頁8行の「TP8-569」を「TP8-5G9」と補正する。

## 請求の報題

- (1) ヒトの組織因子重換タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する配列を含む、わずか12,0000メクレオチド塩法対を含むDNA断片。
- (2) 上記構造速伝子が、以下のアミノ酸酸基配列を有するタンパク質をコードする、 は京の範囲(I)記載のDNA断片。

10	20	30	. 40
SGTTNTVAAY	NLTWKSTNPK	TILEWEPKPV	NQVYTVQIST
. 50	60	. 70	80
KEGDWKEKCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
. 90	100	110	120
GNVESTGSAG	EPLYENSPEP	TPYLETNLGO	PTIQSFEQVG
. 130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRNNTP	LSLRDVPGRD	LIYTLYYWXS
170	180	190	. 200
SSSCRETART	NTNEFLIDVD	KGENYCPSVQ	AVIPSRTVER
210	220	230	240
Ketdspvech	GQEKGEFREI	PYLIGAVVPV	VIILVIILAI
250	260		
SLHKCRKAGV	GOSWKENSPI.	NVS .	*

(3) 上記得通道技士が、以下のメクレオナト現金配列を有する。は次の配面(2) 記載のDNA断片。

	S C T T H T V A A Y H L T U K S T TEACCLACALAINSTITACTICEAACTACAATCAACT 130 140 150 150 150 180	្ធខ្លួ	» ភូនិ	= 3 S	F 5 5
	∽ౖౖౖ	≃≰°	, <b>~</b> E_	' <b>⊢</b> §*	~ 8 ^
	×₹	2 g	> F	ي ق	<b>~</b> §
	> 25 6	- A K 9	≃ g o	ء و با د	្តខ្លុំ
	~ Ş ~	ပုန္လို ဆိ	. < š	្ភខ្លុះ	7 5 2
	⊸ <u>₹</u> .	<b>័</b> ភ ថ្មី	۲ کا د	ء <del>ا</del>	r 5
٠	≂ ¥a	¥5,	~ § _	r Š.	ૂ ર્ફ
	~ <u>15 9</u>	rĕ∺	+83×	~ 22	25 K
	. < ડું	~ g	o- ₹	204	24
	< Š	₹	× 3	<u> ~</u> Š	
	> 6 3	~}2	<u>&gt;</u> .≩ 8	ធខ្លី≳	> ¥ 5
	الم الم	> <del>[</del>	- 5	<u></u> 5₹	282
	≖ ¥	<u>- 5</u>	` <b>₩</b> 3	m S	្ត់ខ្ព
	μŞĝ	≻ ¥ S	> 6 2	~ <u>₹</u> o	× 4 °
	+ ÿ <sup>~</sup>	> 6~	- £ ∺	~ કેં ≥	្ទន្នន
	ဗ႘ၟ	~ કુ	# 월 .	- Ę	× §
	∞ b S	~ \{ 0	- g -	* 35	⊬ <u>₫</u>
	×	> ह≅	+84	6 g Ş	စန္တိန္တီ
	•	~ §	- Ĕ	< ₹	⊳ <b>g</b>
•		×3.	٦ڦ	* E	~ §
		~ 8 ±	ပဠန္က	ပန္ကြန္တ	4 <b>3 3</b>
		<u>"                                    </u>	" <b>§</b>	₽ğ	~ <u>E</u>
		. g _	1 3	~ ğ	∞ Ş
		_88	្នំខ្លួ	- 3 g S	م§5
		ΞE	_3	<b>^</b> 6	- E
		M F K T I L E W E P K P V M Q Y T V Q I S T K S C D W K S ANTHEMAGNATHERACECHACCCANCECTANTEMACATAMEMATINETANAME 190 200 210 220 240 240 240 250 260 270	K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D Y K Q T Y L A R V F S ANITOCITIAN CANANAMANAMANAMANAMANAMANAMANAMANAMANAMA	Y P A C N V E S T G S A G R P L Y E N S P E P T P Y L E T N TACCOCCACCANTITICA.CATACCACTACACACACACACACACACACACACACAC	L C Q P I I Q S P E Q V O T K V M V I V E D E R T L V R R F CTOCRACICACIONITATIONACIONICANICANICANICANICANICANICANICANICANICA
		¥ § §	LÈ2	_38 <u>2</u>	_ 8 3
		្ត្	ូ ទូ ``	] §	្សី។
		≖ <del>5</del>	<b>∡</b> ₹	کی	_ §
		_	~	<b>₽</b> 2	- G

(4) 上紀禄遠遠伝子が、以下のアミノ散改基配列を有する可存性とト組織因子量 娘タンパク質をコードする、請求の範囲(1) 記載のDNA断片。

٠			•	:
	10	20	30	40
	SGTTNTVAAY	nltwkstnpk	TILEWEPKPV	· NOVYTVQIST
			· .	
	50	. 60	70	. во
	KSGDWKSKCP	YTTOTECOLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
				•
	90	100	110	120
	GHVESTGEAG	eplyens pe <b>p</b>	TPYLETHLGQ	PTIQSPEQVG
				.*
	130	140	150	160
	TKVNVTVEDE	RTLVRRHNTP:	LSLRÖVPGKD	LIYTLYYWKS
	170	180	190	200
	SSSCKKTAKT		KGENYCPSVQ	
	•			
	210			•
	KSTDSPVECM	GQEKGEFRE		

(5) 上記様遠遠伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する。娘求の範囲(4) 記載のDNA断片。

(6) 上記配列(第1の配列)の5°末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ 末端に結合した、アミノ酸残落リーダ配列をコードする第2の配列も含み、か つ該第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重頻前駆体タンパク質をコード する混成構造遺伝子を規定する、錆水の範囲(1)配載のDNA断片。

(7) 上紀撰成構造遺伝子が、以下のアミノ散残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(8)記載のDNA断片。

10	. 20	30	40
SGTTNTVAAY	nltwkstnpk	TILEWEPKPV	ROVYTVQIST
50	. 60	70	80
KSGDWKSKCF	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVFSYPA
	•		
90	, 100	110	120
GNVESTGSAG	EPLYENSPEP	TPYLETHLGQ	PTIQSFEQVG
		•	
.130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRNNTP-	LSLRDVFGKD	Liytlyywks
170	180		
		190	
SSSCRATART	NTHEPLIDVD	KGENYCPSVQ	AVIPSRTVNR
210	220	230	240
•	GQEKGEFREI		
	ogunou, naz		VIIIVIIIMI .
250	260		
SLHKCRKAGV	GOSWKENSPL	หงร	

(8) 上記提成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩落配列を有する、請求の範囲 (7) 記載のDNA断片。

平成 7.12.20 発行

(9) 上記遊成構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有する、可格性ヒト組織 因子重額タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(6)配数のDNA断片。

. не	-30 TPAWPRVPRP	-20 ETAVARTLLL	-10 GWVPAQVAGA
10	20	30	. 40
SGTTNTVAAY	nltwkstnpk <sub>.</sub>	TILEWEPKPV	ngvytvqi st ·
50	60	70	••
RSGDWXSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKOVKOT	#10 Ylarupsypa
90	100	110	. 120
GNVESTGSAG	eplyenspep	TPYLETNLGQ	PTIQSPEQVG
130	140	150	160
TKVNYTVEDE	RTLVRRNNTP	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWXS
170	180	190	200
SSSCRRTART	ntneplidud	KGENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
210	•		
KSTDSPVECM	GQEXGEPRE		

(10)上配混成構造遠伝子が、以下のヌクレオチト塩基配列を有する、請求の範囲 (9) 配載のDNA新片。

平成 7. 12. 20

(13)上紀禄廷遠伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (11)

記載の組換えDNA分子。

S C T T H T V A A Y N L T U K S T TGOCCACTACAATACACTCCACCATATATTTAACTTCCAAATCAACT	H P K T I L E W E P K P W Q V Y T V Q I S T K S C D V K S ATTICAMCACATTICACACATTCCAAAAAAAAAAAAAAAA	K C F Y T T B T E C B L T D E I V K D Y K Q T Y L A R V F S AANTGETTITIKAGAACATACTTGCCACGGGTTGTTGAACATACTTGCCACGGGTTGTTGCCACGGGTTGTTGTGCAAGATTGTGTAGAAGATACTTGCAAGATACTTGCAAGAGAAGATACTTGCAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA	Y P A G H V E S T G S A G E P L Y E H S P E F T P Y L P T H TACCGCCACCCAATGTCCAACACCTTCTCTCTCTCACAAAC 370 340 350 400 410 420 430 440 A50	L G Q P 7 1 Q S F E Q V G T K V N V T V E D E R T L V R R K Ctechacacacacalcalateracacacacacacacacacacacacacacacacacacac
ოქ	∡ ≨ `	- H	⊬ថ្ន	<b>=</b> ₹
S G T T M T V A A Y N L T V K S T CACCACTACAMIACTECCACATAMATITACTECCAMICACT  140 150 150 150 150 150 150 150 150 150 15	> છે	> [	~ Š	≖ હેં
ာ ဗို ဝ	°É°	~ g ~	75.	, g
.F.≃		382	ိုပ္ပန္	្តិខ្លួ
ົ.≩	Š	ે કે	( P	76
JE	۳Ę	7 F	~ 8	# 8
. ₹ 5 o	¥ Š o	~ <u>š</u> o	٠Şċ	# 8 e
~ 13 %	누출위	►월A	-F3	교중점
ج کِ	ກ ຊີ	σ×	<b>⋼</b> 8.	9 5
< §	~ <u>}</u>	׊	~Š	ωŠ
> 22	~ <b>₹</b> ş	~疫병	" ខ្លួន	252
_ H ~	_ E ~	, Eu	_ F 4	្ត្រីង
_ ¥	. 2	_ 8	~3	ីទី
* ≨	- 3	<b>≚</b> ∄	" కై	2 5
무성유	> £ 8	> E &	<b>≻</b> <u>₹</u> 3	<b>₹</b>
⊬ ਨੂੰ	? 5 "	-Ę"	78.	> 5
ပ ဗ္ဗိ	~₹	<b>ພ</b>	<b>⊷</b> 5	×§ √
`ធ ថ្មី <u> </u>	* 5 a		₩ Š	₩₫ <u>.</u>
.a to E	> 2 %	rõž	~ § §	0 g 🕏
	• Š	7 g	<b>₹</b> 5	> P
	׊	_ ×	~ £	~3
	~82	ມ <b>ຣິ</b> 8	E 2	m ž ģ
	<b>"</b> ≱~	្ខទ្ធក	្តិខ្លួក	_ E •
	_ g	_ 3	_3	
	. 5	์ ซี	ેં કે	. 3
	<b>"</b> දු දූ	~ § §	* g 🖁	్ రైస్త
	7 E	+3	> 5	~ 5
	- Ę	► Ş	≈\{ }	۲۰۵
	٠Ž	> <u>}</u> _	ь <u>8</u>	- វូ
	× § ≥	~ E &	< 8 6	~ § \$
	νĘ	ပည်	⊾ ğ	မ နို
	2 F	∡ Ş́	× 55	٦Ħ
	~	<	-	•

(14)さらに、上記第1の断片の5′末端に速装し、かつ上記タンパク質に結合し た、アミノ政務基リーダー配列をコードし、かつ検第1及び第2のDNA断片 が、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構造遺伝子を規定する、構求の 範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

(15)上記混成構造遺伝子が、以下のアミノ酸核芸配列に対応するアミノ酸残基配 列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の範囲 (II) 記載の 組換えDNA分子。

(!!)ピト組織因子重験タンパク賞をコードする構造遺伝子を規定する第1の
DNA断片に機能的に結合したベクターを含む組換えDNA分子。

. (12)上記憶造道伝子が、以下のアミノ監疫基配列を有するタンパク質をコードす る、請求の範囲 (II) 記載の組換えDNA分子。

10	20	. 30	40
SGTTNTVAAY	NLTWKSTNPK	TILEWEPKPV	NOVÝTVQIST
50	60	. 70	. 80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEİAKDAKĞI	YLARYPSYPA
	:		,
. 90	100	110	120
GNVESTGSAG	<b>EPLYENSPEP</b>	TPYLETNICO	PTIQSPEQVG
		-	
		• .	
130	. 140	. 150.	160
TKVHVTVEDE	RTLVRRNNTP-	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWKS
	•		
•			
170	180	190	200
SSSCKKTAKT	NTNEFLIDVD	KGENYCFSVQ	AVIPSRIVNR
	••		
·			
<del>2</del> 10	220	230	240
KSTDSPVECM	GOERGEPREI	PYTIGAVVPV	VIILVIILAI
•		: -	•
, 2,50	- :. 260		•
SLHKCRKAGY	Goswkenspl	พงร	

H T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y 4 K S S S G K K T AMACTITICTAMCCICCCCCATCITITICCAMCTAMITIATICAMICTICAMCTICACCAMICAMACA S50 550 550 550 610 620 630	A K T H T H B F L I D V D K G B H Y C P S V Q A V I P S R T GCAMMCAMCACACIONITACATCACTACACTACATCACACTACACACTACACACAC	V N R K S T D S P V E C K G Q E K C E P B B I F Y I I G A V GTAACCCCAAAAAAAAAATACAAAAAAAAATAAAAAAAAA	V F V V I I L V I I L A I S L H K C R K A G V G Q S U K E N CTATIVICOTCATATATOTCATOTATATATATATATATATATATATA	
<b>⊿</b> ≸	≃ હું	٠ ئغ· · · ·	3 g	
. ⊶.ફ	က ညို	ပ ဋိ	~ હૈ	
ပ်္ပို့ဗ္တ	∼ខ្ពុ	-£8	≥ភ្ជី៩	
က္ဦးမ	- 5	1 5 E	ဖည့်≕	
ະນຸ ເຊິ	·> 5	≻ Š	~ දි	
~ Pe	< ইু ু	~Fa	မ မွ	
~ ក្តី ខ	-68€	· ~	> € ≆	
~ ૅૂ	> Ę	<b>ო</b> გ ∙	ర క్ర	
2 5	พยี	# Š	્ર છું _	•
~ \\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\	~ E S	* E *	×≸£	
ž	ပည်	₽ ₹	× §	
. 5	<u>~</u> €	ပမ္မ	9 8	
[ § §		× 3 2	× 3 2	
ΞÈ	~ §	~ ថ្ង	<u>-</u> ₹	
₹	ک ک	Ĕğ	- E	
258	1 4 5 6 2 4 6	752	25.5	
× 8	> E	ع ک	~ E	
្ស	24	<b>4</b> 5	ျှဋ	
~ ES	-Es	> 15 8	7 g 3	
<b>►</b> 5	~ <u>E</u>	<u>~</u> 8 ^	~ § ~	
a Š	~ E	~ Š	> 5	
<b>≠</b> ႘ို ငွ	<b>~</b> 5 5 €	_ 3 g	-£8	
٦g~	<b>≖</b> } *	- 3 ~	~ § ≈	∞ឬ
υŘ	<b>⊢</b> 5	νģ	~ \x	> 5
z ji c	* Š≘	* š =	٥ يا د	≈ ¥ ₀
H T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y U K S S S G K K T WGAGTTTCCTMACTCTCACCCACCACACAMCACAMCACAMC	+ 3 g	™ 93 L	> 52 <b>2</b>	S P L N V S TCCCACTCATCITTCA 910
_ A	* ₹	* Š	٠Ę	~გ .
<del>*</del> \$	< ບູ	> F	> E	აგ.

(18)上紀茂成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチ ド塩基配列を有する、精水の範囲(15)紀載の組換えDNA分子。

				•	
- 88	2 - 52	ក្កខ្ល	8.9	_ 4 0	vo
<u>~</u> §	~ § ~		25.5		
- ∢ 5	<sup>™</sup>	_ §	_ 6	3	2 5
> 5 9	្នាស្តី	Ę			<b>.</b> 3
~8"	, <sup>⊁</sup> £≎	25.5	7 2 2	_ 6 3	768
⊢ કુ	,, ≸	, 3 , 3	38	Ĩ.	- E
₩Ş_	. <u></u> .	<u> </u>	_ [	_ g	្នៃទី
_	<b>≻</b> ₹9		_ E # 3	្តិខ្លួន	្តីខ្លួ
ATTORAGE COCTOCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	⊸ ই	ั้งจี	~§``	Ξξ*	g
- <u>8</u>	<b>∢</b> ŏ	_ ₹	Ĵĝ	7.8	
> 5 3	252	~ <b>≸</b> ≈	§ 5	_ 3 -	" ຢູ່
. ≖ 8	<u> </u>	> E ~	752	្តិថ្ងៃ	ិ ទូ គ
_	~ ₹	. E	_8		_ 8
- ğ g	₽ <b>3</b> °	្ត់ថ្មី			75
. <b>~</b> ∑ "	- § ≈	_ <u>E</u> ≅	"FX	`£≅	្តិខ្លួន
~ ₹	မ္မရွိ	~ ₹	<b>,</b> 5 €	- <u>L</u>	_§
. ► § ~	∽ฐี	<b>≖</b> \$ _	28	§	_3
n 9 -€	<b>ব্</b> টু ঐ	<b>►</b> 22 ≈	-88	္မမွန္	
× P	ს წ	~ 8€	٦ğ.	<b>₹</b>	> g
	<b>₹8</b>	×₹	- 3	۳ <u>و</u>	-3
	> 8 %	≖ខ្លួ≋	ပဋိန္တ	0 K S	₩ ¥ 8,
	<b>~</b> ₹	₩ફ	<b>-</b> 8	<b>⊢</b> ₫``	~Ĕ
•	₹8	> ğ	<b>⊢</b> 3	က ဂ္ဂိ	• Ē
	_ E≅	ងខ្លួ	4 § §	™ន្តីទ	0 g g
	25	- E	٠٩"	> [ ]	-5*
	. ģ ·		r g	* §	⊬₫
	្តិខ្លួន	្តីទ	ŽĖ:	ပဋိဋ	~ § s
	L L C W V F A Q V A C A S C T I W I Y W A Y W Y I W K S T CTCTCTCCCCACCAIRTMATTCCACALATAMTTACTCCCACALATAMTTACTCCCACALATAMTTACTCCACALATAMTTACTCCACALATAMTTACTCCACATACAATAMTTACACACACACACACAC	N P K T I L E W B P K P W Q V Y T V Q 1 S T K S G D W K S ANTITAMACACHYTICAMICCAMACCCIANTCAMICAMICAMICAMICAMICAMICAMICAMICAMICAMI	K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D Y K Q T T L A R V F S ANTECTITIACICALCACACACACACACACACACACACACACACACAC	YPACHY ESTGSACE PLYEHSPETTPYCTACHOCHOCHOCHOCHOCHOCHOCHOCHOCHOCHOCHOCHOC	L C Q P T I Q S P E Q V C T K V N Y T V E D E R T L V R K K TTCCRACACCAACTTACACACTTTCACACCTTACTCACACCAAC 450 470 489 450 500 510 520 530 540 540
	7 <del>5</del>	ŢĘ	. ž	~ 8	် မွ
	9	≺ .	~ ~	~ F	- T

	-30	-20	-10
ME	TPAWPRVPRP	ETAVARTLLL	GWYPAQVAGA
10	20	30	40
SGTTNTVAAY	nltwrstnfk	TILEWEPKPV	NOVYTVQIST
50	60	70	. 80
KSCDWKSKCP		DEIVKDVKQT	
90	100	110	. 120
GNVESTGEAG		TPYLETILGO	
130	140	150	160
TKVHVTVEDB	RTLVRRNNTP	LSLRDVPCKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
559GXXTAKT	NTHEFLIDVD	RGENYCPSVQ	AVIPSRTVNR
210		230	240
KSTDSPVECM	GQEXGEPREI	PYIIGAVVPV	AIIFAIIFYİ
250	260		
SLEXCRXAGV	GOSWKENSPL	HVS	

(17)上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮しうる、結束の 報題 (11) 記載の組換えDNA分子。

(18)上記ペクターが、宿主網胞中、上記タンパク質を発現しうる、辨水の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

(19)上記ペクターか、宿主網路中、上記前駆体タンパク質を発現しうる、精求の 税器 (14) 記載の根換えDNA分子。

(20)上記ペクターが、p K S V - I O であり、かつ、上記風成構造運伝子が、可 溶型の上記詞駆体タンパク質をコードし、かつ、以下のヌクレオチド配列を有 する、請求の範囲 (19) 記載の組換えDNA分子。

ACTIVE CLASSIC SECTION SAND SECTION SE

(21)わずか50アミノ放務基を含み、かつ、

-VNQYYTYQIST-, 及び

-LYYWKSSSSGKKT --

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ放鉄基を含む、 ヒト組織因子結合部位ペプチド類似物。

(22)上記ポリペプチドが、式:

H-VNQVYTVQIST-OH

で表われる、請求の範囲 (21) 記載のポリペプチド類似物。 (22)上記ポリペプチドが、式:

H-LYYWKSSSSCKKT-OH

で表われる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド類似物。

(24) H-BPKPYNQYYTYQ15TKSGDMKSKC-OH .

H-VPCKDLIYTLYYWKSSSSCKKT-DB 、及び

H-SSSGRKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSV-OH.

からなる群から選ばれた式で扱わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド版 似物。

(25)

H-SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPV-OH, H-TKSGDMKSKC-PYTTDTECOLTDEIVKDVKQTY-OH, H-ESGDMKSKC-OH, H-ECDLTDEIVKDVXQTY-OH, H-LARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLC-OH, H-YENSPEFTPYLETNLGQFTIQSFEQVGTKV-OH, RU H-QAVIPSRTVNRKSTDSPVEC-OH.

からなる群から選ばれた式で扱わされるヒト組織因子結合部位ボリペプチド類 似物。

(26)a)ヒト組織因子重頻タンパク質と免疫反応し、

ы

H-EPRPVNQVYTVQISTXSGDNXSKC-OH,
H-VFGKDLIYTLIYUKSSSSGNXT-OB,
H-SSSGNXTAXTHNEFLIDVDRGENYCFSV-OH,
H-SGTHTVAAYHLTWASTNFKTILEWEPRPV-OH,
H-TXSGDNKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQYY-OH,
H-KSGDNKSKC-OB,
R-ECDLTDEIVKDVKQTY-OH,
H-LARVISYPAGNVESTGSAGEPLYENSPETTTYLC-OH,
H-YINSPETTYLLTHLGQPTIOSPEQVGTKY-OH, RUH-QAVIPSRTVNRNSTDSFVEC-OH, RU-

からなる群から選ばれた式で表わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ c) DSPYRCM CQEXCEPRE1 PYIICA で示されるポリペプチドと実質的に免疫 反応しない、

抗体分子を含む、抗体組成物。

(27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲 (28) 記載の組成物。

(28)上記銘体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、請求の範囲 (28) 配載の組成物。

(29)ヒト超線因子重線タンパク質及び配列:BPKPV NQYTVQIST KSGDWKSKC で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を虚生する。 TP8-5G 9と命名されたハイブリドーマ。

(30)請求の範囲 (29) 記載のハイブリドーマにより度生される抗体分子を含むモ ブクローナル抗体組成物。

(31)とト組権因子重換タンパク質及び配列: EPKPV NQVYTVQIST KSGDWKSKC で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を定生する、TF9-10 H10と命名された、ハイブリドーマ。

(32) 請求の範囲 (31) 記載のハイブリドーマにより農生される抗体分子を含むモ ノラローナル抗体組成物。

(33)とト組模因子重増タンパク質及び配列:VFGXD LIYTLYYMS SSSCXXT で表 わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-884と 命名したハイブリドーマ。

- (34)前水の範囲 (33) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモ ノクローナル抗体組成物。
- (35)a) 身体サンブルを、ヒト組織図子重線タンパク質と混合し、免疫反応混合 物を作る:
  - b) この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反 応し、免疫反応度物を形成するのに十分な時間維持する、そして、
  - c) ステップb)で生成した免疫反応度物の存在を検定する、

以上a)~c)のステップを含む、体液サンプル中のヒト組織因子遺験タン パク質の存在を検定する方法。

- (36)&) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージを含むサンプ ル中に存在するとト組織因子遺類タンパク質の存在を検定するための、キッ トの形をした診断システム。
- (37)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、
  - a) TP8-5G9.
  - b) TF9-8B4.
  - c) TF9-10H10

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲(36)記 紋の診断システム。

- (38)() サンブルを、請求の範囲(15)記載のポリペプチドを固体マトリックスに ・固定した固体サポートと混合して、結合反応混合物を形成する、
- b) 上記結合反応混合物を、凝血因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複 合体及び上滑を形成するのに十分な時間維持する。
- c) 上記復合体から上記上清を分離する、及び
- d) ステップc) の分離した複合体から、上記凝血因子を回収する、
- 以上、a) ~d) のスチャブを含む、サンブルから血液凝固因子短/Waを 単離する方法。
- (39)実質的に、ヒト組織因子経緯タンパク質を含まない生理学的活性のあるヒト 組織因子環鎖タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (40)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重维タンパク質を、リン肪質中に分散
- (43)(4)かなくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子軽頻 タンパク質を含まない、生物学的活性のあるヒト組織因子重線タンパク質の 水溶液を含有する組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を検定するキットの形をしたは 断システム。

- (44)上記重線タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲(43)記載の診 断システム。
- (45)上記タンパク質が可容性であり、かつ、以下のアミノ酸残差配列を有する、 請求の範囲(43)記載の診断システム。

. 10	20	30	. 40
SGTTHTVAÄY	nltwxstnpk	TILEWEPKPV	NOVYTVQIST
50	, 60	70	
KSGDWKSKCF	YTTOTECOLT	DEIVNDVKQT	YLARVPSYPA
90	100	110	120
GNVESTGSAG	EPLYENSPEP	TPYLETNLGQ	PTIQSPEQVG
130.	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRNNTF	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWKS
	•	•	
170	180	190	200

SSSGRRTART NTHEFLIDVD RGENYCPSVQ AVIPSRTVHR

210 KSTDSPVECM GQEKGEFRE 平成 7. 12. 20

(41)上記溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(39)記載の組成物。 (42)上記タンパク質が可給性であり、かつ、以下のアミノ酸残益配列を有する、 請求の範囲(39)記載の組成物。

10	20	30	40
EGTTHTVAAY	HLTWKSTHPK	TILEWEPKPV	NQVYTVQIST
50	60	70	80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKOVKQT	Ylarupsypa
90	100	110	120
Gavestgsag	EPLYENSPEP	TPYLETNLGQ	PTIQSPEQVG
130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRNNTP	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSGKKTAKT	N7NEPLIDVD	RGENYCPSVQ	AVIPSRTVNR
210 KSTD9PVECH	GQEKGEPRE		

- (46)a)ヒト組織因子重線タンパク質をコードする構造遺伝子を原定する第1のD NA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結 合する、アミノ酸鉄基リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、政第 1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする混成構 造遺伝子を規定しているDNA断片と機能的に結合する、水乳類細胞に適合 する発現ペクターを含む組換えDNA分子でトランスホームした水乳類細胞 の栄養培地での培養を開始する;
- b)上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、 かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして c)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する、

以上、a)~c)のステップを含む、成熟ヒト組織因子重量タンパク質の調 智方法。

(47)上贮流成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (46)配載の方法。

(48)請求の範囲(46)記載の方法により座生した。成熟ヒト組織因子重娘タンパク 質を基本的に含む組成物。

(49)請求の範囲(47)記載の方法により産生した成熟とト組織因子重請タンパク質を基本的に含む組成物。

(50) 上ト組織因子重線タンパク質及び配列: DYKPY NQYITVQIST XSGDWXSXCで扱わ されるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF-9-5B7と 命名されたハイブリドーマ。

(51)請求の範囲(50)配載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノ クローナル抗体組成物。 乔 铙 袖 正 壽 (方式)

平成 7. 3 28 月 日 |**1**|||

特許庁長官 第

昭和63年特許顧第503555号 (PCT/US88/00888).

2 発明の名称

ヒトの組織因子に関連するDNA 断片・ポリペプチド及び抗体

3.論正をする者

1.事件の表示

む作との関係 出 蝦 人

名称

スクリップス リクリニック アンド リサーチ

4代 項 人 任 所

東京都千代用区丸の内3丁目3番1号 電話 (代) 3211-8741

氏 名

(5985) 弁理士 中 村

S.湘正命令の日付

平成1年8月22日

1.補正の対象

明細音および請求の範囲の離訳文

| 図面の解釈文(第3、9、10、11、12、13、14、16、17図)

7. 諸正の内容

異紙のとおり

「明福書、埼泉の範囲および図面の解釈文(第3、9、10、1) 13、14、16、17図)の許彦 (内容に変更なし)

カヹ (畑)

### 明 超 春

ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ ポリペプチド及び抗体

## (本出版の関連文献)

本出別は、1987年3月31日に出願された米国出願第033,047号及び1987年6月25日に出願された出願第067,103号の部分継続出願である。

## (技裕分野)

本発明は、ヒトの組織因子重額タンパク質(h u T F h)をコードする構造違伝子を有する組織えDNA分子(r D N A)に関し、より詳細には、本発明は、宿主細胞中に含まれる、h u T F h を発現しつる発現ベクターに関するものである。また、本発明はh u T F h の合成ポリペプチド類似物及び h u T F h 及び旅ポリペプチド類似物及び h u T F h 及び旅ポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関する。

## (発明の背景)

凝血は、一群の最重因子として知られる網胞性及び血無性タンパク質によって仲介される、一選の、酵素、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケードの開始は、組織因子(TF)として知られる細胞性レセプターが、凝集因子可又はその誤事体、因子以。と結合し、触ば的に活性のある複合体を形成したときに起こる。TPの非存在下、及び複合体への連続する結合がない場合には、サノリ。は凝集を開始しない。従って、TPの化学的かつ生化学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環 静中で可溶化しておらず、また、因子 W ノW a 及び他の凝集因子を含む血漿タンパク質と接触できないこ とが分っている、膜に結合した彼タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性剤及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン( Memerson )、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション( J. Clin. Invest. ) 4 7~7 2 頁(1968) t ネマーソン( Hemerson )。ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション( J. Clin. Invest. ) 4 8~3 2 2 頁(1969 年) 及びカーソン( Cerson ) 等、サイエンス( Science ) 、208巻、307 頁 (1980年) 台頭。

単離した、もしくは、再設質化したTF合有タンパク質調製物は、数キの種の組織から抽出物によって調製した。組織因子は、 天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。 古典的方法のレヴューとしては、ネマーソン(Kemerson) 等の 報告(プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンボシス (Pros. Hem. Thron.) 6巻、237~261頁(1982年) を必要せよ。

最近、プローズ(Broze)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Blot. Chem.)260巻、10917~20(1985年))ボム(Bom)等(トロンボ・リサーチ(Thromb. Res.)42巻、635~643頁(1986年)及びグハ(Guba)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.)USA83巻、299~302頁(1986年)は、脱脂質化組満因子タンパク質を、非イオン性界面活性形及びCaCacacを含む水溶性溶液に溶かした時、核タンパク質が因子ゼノバコと結合するという発見に基づいた方法を用いて、ヒトの組織因子(huTF)タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。これ

選常、血管を形成している細胞の表面上には発現されていないが、 血管中の単類によるその発現は、パクテリアのリポ多級のような 感染性は領域分、ある抗原により刺激されたTへルパー細胞から 誘導され、直接的にはある刺激されたTへルパー細胞由来のリン ホカイン及び免疫複合体によって誘導することができる。例えば パクテリアのリポ多種同様、インターロイキン1及び腹落境死因 子アルフェのような単細胞/マクロフェージのある炎症仲介物は 血質の体液便表面にTPを発現する内皮細胞を刺激することがで きる。 典型的に、血管要素におけるTFの発現は、拡大する血管 内歇血又は、局部的な凝血の開始、すなわち血栓形成を起こす。

組織因子は、試験管内の微維導和的を含む培養物中のある血管 外組跡、未同定型の疑細胞及び基底膜パリヤーにより、循環する 血器タンパク質から分離されている上皮細胞の表面上に構成的に 発現される。これら細胞上のTPの存在は、組織損傷の結果とし ての血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、凝血 システムが開始する基礎である。

ハウウェル(Bowell) (アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(Am. J. Physiol.) 31 単1 頁(1912年))の報告は、TPを含む単離した組織タンパク質調整物は、リン酸質ータンパク質(リボタンパク質) 複合体として存在するときのみ恐気を促進することができることを示す最初の報告である。 裏型的に、TP含有組織タンパク質の単型が、適常TPタンパク質とないので、単純したタンパク質を再脂質化することによるTPの根節的プロコフグラント活性の再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多くの研究者によって行なわれてきている。例えば、耐無活性の回復は、リン胞質のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成

ら方法の使用は、有意量の単離V/VI。を入手することの困難性 のみならず、因子VI/VI。の不安定性によっても制限される。

プローズ等(上記)は、huTFに特異的なモノクローナル抗体の開発及び免疫規和性吸着体としてのそれらの使用は、因子リノリョ使用の制限によって起こる問題を回避できることを指差している。しかし、抗っhuTFモノクローナル抗体は、放文献中には報告されていない。さらに、子牛のTFによって生じる2つのモノクローナル抗体(カーソン(Caraca)等、ブラッド(Blood)。662 巻156 頁(1985年))は、huTFとは免疫反応を起こさない(グハ(Geha)等、上記)。

## (本発明の概要)

1 つの原様において、本発明は、ヒトの退機因子重額(hoTFh) タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を合む、わず か約12.000塩基対を含む DNA 断片を考案している。 協構造 遺伝子が、第1回の約1者から約263者で示されている アミノ 数残活を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。 さ らに、抜構造遺伝子は、第2回の約130番から、約918巻で 示されるヌクレオチド塩盃配列を有することが好ましい。

望ましい戯様においては、そのDNAU片は、第1の配列の5、末端と連続し、かつ、huTPhタンパク質のフェノ末端に結合したアミノ酸残益リーダー配列をコードする第2の配列をも含む。その第1及び第2のDNA配列は一緒になって、ヒトの組織因子重領前駆体(プレトuTFh)タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義している。抜混成構造遺伝子は第1回の約~32番から約263番で示されるフェノ酸残器を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、協構成構造遺伝子は、第2回の約34番から約918番のスクレオチド塩菱配列を

有することが築ましい。

別の転換において、本発明は、ヒトの組物因子重観タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を足襲する第1のDNA断片と機能的に結合したベクターを含む超額えDNA分子を考案している。さらに該超額入DNA分子は、第1の断片の5 \*\* 末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ散烈差リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一緒になって、上記タンパク質の前駆体をコードする流成構成遺伝子を定義している。

別の威機において、本発明は、わずか約50プミノ放残益を含 み、かつ式

## · - V N Q V Y T -

で表わされる配列に相当するアミノ散残器配列を含むヒトの組織 因子結合部位のポリペプチド類似物を今楽している。

さらに好ましくは、本発明はわずか約50アミノ改残基を合み、 かつ、

## - VEGVITYOIST - . AU

## - LYYWESSESKET -

からなる群から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ 酸残蓄を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチャ類似物を考 思している。

さらに本発明の超様には、

- a) ヒトの組織因子重額タンパク質と免疫反応する、
- b) H-EWEPKPVNQVYT-OH,
  - H-EPKPVHQVYTVQISTKSGDHKSKC-OH,
- H-VFGXDLIYTLYYWKSSSSGXXT-OR,
  - N-RDVFGXDLIYTLYYKK-OH
- H-IYTLYYWKSSSSGKKTAK-OH,
- H-SSSGXXTAXTHTNEFLIDVDXGENYCFSV-OH,

## また、本発明は、

- a) 生理学的に許容される希教解及び効果的な生体内指示手段と 結合させたハイブリドーマTP9-10H10によって作られ たある貴の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者 に静脈注射により投与し、血栓中に存在するヒトの組織因子と 免疫反応させる、
- b) 族抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子 と免疫反応し、かつ、免疫反応物質を形成するのに十分な時間、 その投与を受けた被検者を維持する。
- c) ステップ b) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する、 以上 ») ~ c) のステップを含む、生体内で血栓を検出する方法 も考案した。

さらに、本発明は、TP8-5 C 9 及びTF9-6 B 4 からなる P から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在する ヒトの B 被囚子と効率よく結合する、ある量の抗体分子を含む生理学的に許容される 希权利を含有する モノクローナル抗体組成物を、被検索に静原注射によっと投与することを含む、生体内で、凝集 因子 4 / 1/1 a と結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も 考定している。

また、本発明は、因子VI/VIコと反応するのに有効な量の、

H-EWEPKPVNQVYT-OH,
H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWSSCC-OH,
H-PKPCKDLIYTLYYWKSSSSGKXT-OH,
H-RDVJGKDLIYTLYYWK-OH
H-IYTLYYWKSSSSGKXTAK-OH, RØ
H-SSSGKXTAKTNTNEFLIDVDXGENYCFSV-OH;

からなる群から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

H-TKSGDWKSKCFYTIDTECDLTDZIVKDVKQTY-OH

H-KSGDWKSKC-OH,

H-ECDLTDEIVXDVKQTY-OH,

H-LARVESYPAGIVESTGSAGEPLYENSPETTPYLC-OH,

H-YENSPETTPYLETHLGOPTIQSFEQVGTKV-OH, RO

H-QAVIPSRTVURKSTOSPVEC-OH: AD

からなる界から選択される式で変わされるポリペプチドと免疫 反応する、

c.) 実質的に第1図の部位20kから部位228で示される式で 要わされるポリペプチドとは免疫反応しない、

## 抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマTP8-5 G 9、TP9-10日10、TF9-5 B 7及びTF9-6 B 4 と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗 体組成物を表案している。

本确筑は、

- a) 身体試料を、ヒトの組織因子重線タンパク質と混合し、免疫 反応混合物を作る、 :
- b) その混合物を、抗体が、その試料中に存在するヒトの観機団 子と免疫反応し、免疫反応皮物を作るのに十分な時間維持する、 そして、
- で) ステップも) で生じた免疫反応駆物の存在を検出する、 以上のステップを含む体液試料中のヒトの超機因子重額タンパク 質の存在を検定する方法も考案している。

る希釈剤を含有するポリペプチド組成物を、静原注射で被検管に 投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、凝集因子で ノVIaに結合することを阻害する方法を考案している。

別の態様において、本発明は、本発明の抗体組成物を含有する パッケージを含む、試料中のヒトの組織因子重質タンパク質の存 在を検定する、キットの形をとった診断システムを考案している。 その抗体組成物は、

- a) TF8-5G9.
- b) TF9-684.
- c) TF9-10H10,
- d) TF9-5B7.

からなるハイブリドーマの母から選ばれたハイブリドーマにより 生産されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

京た、試料から血液凝集因子VI/VIコを単踏する方法も考案された。・

この方法は、

- )固体マトリックスに固定した、請求項15記載のポリペプチ ドを合む固体サポートとは料を混合することにより結合反応混 合物を作る、
- b) 上記結合反応混合物を、上記磁集因子が上記ポリペプチドと 結合し、固体複合体及び上摘を作るのに十分な時間、維持する、
- c) 上記復合体から、上記上清を分離する、そして
- d)ステップ c の分離した複合体から、上記職集因子を回収する、 以上、 ») ~ d) のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの退路因子経抜タンパク質を含まない、 生物学的に活性のあるヒトの退路因子重抜タンパク質の水溶液を 含む退成物を考案した。この生物学的に活性のあるヒトの組幣因 子宣領タンパク賞は、リン脳賞又は、非イオン性界面活性剤中に 分散されていることが望ましい。

血管系統体試料中の凝集能力を検定するための、キットの影を とった診断システムも考案された。それは、実質的にとトの組織 因子軽値タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うの に十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重値タン パク質の水溶液組成物を含有するパッケージを含む。その重値タンパク質は、リン脂質中に分散されていることが望ましい。

別の厳操において、成熟したヒトの組織因子重額タンパク質の 関製法及びその方法によるタンパク質発現重物も考案されている。 この方法は、

- a) 栄養物地中、ヒトの組織因子意質タンパク質をコードする様 造遺伝子を定義する第1のDNA断片及びその第1の断片に連 抜し、かつ、上記タンパク質に付随するアミノ破裂器リーダー 配列をコードする第2のDNA断片と機能的に結合し、宿主 鬼類細胞と適合する発現ペクターで、上記第1及び解2のDNA 断片が上記タンパク質の前駆体型をコードする機成構造遺伝子 を定義するものであるようなペクターを含む組織えDNA分子 でトランスホームした宿主 本乳類細胞の符号を開始する、
- b) その培養物を、上記細胞が、上記組換え DNA分子からタンパク質を発現し、かつ、上記成熟型のタンパク質を形成するのに十分な時間検持する、そして、
- c)上記符乗物から、上記成熟型のタンパク質を回収する、以上a)~c)のステップを合む。

図面の簡単な説明

図式は本公開の一部を形成している。

第1回は、1文字アミノ酸残蓄コードを用い、左から右に、ア

トン (k) で示した見かけの分子量をもつ分子量標準物質を示している。

第5 図は、15 Mポリアクリルアミドゲル中で電気体動した、
因子リブリョの観和性で単離した h u T F のオートフルオログラムを示している。 h u T F の早離、1\*\* I によるラベル化及び電気体動は、例4 と同様に行った。レーンA は、D T T でよる還元後の単離した h u T F を示している。レーンB は、D T T 選元なして、電気体動した同サンブルを示している。上のパンド及び下のパンド ( U 及び L と表示した) は、各々、約5 8 及び4 7 k の大きさの h u T F に対応している。オートフルオログラフィー後、上のパンド及び下のパンドを切り出し、D T T を合む S D S サンブルパッファ中で再水和し、第2 の1 5 % アクリルアミドゲルのサンブルフェルに入れ、電気体動した。レーンC は、レーンB から得られた、下のパンドの再電気体動の結果を示している。1 2 5 及び4 7 キログルトン ( k ) の見かけ上の分子量をもつクンパク質が矢印で示されている。

第6図は、例4で説明されているように、まずAuTF特異的モノクローナル抗体で免疫比別化し、ついで8~17%のポリアクリルアミド勾配ゲルで電気泳動した、因子以ブロョの観和性で単郷したトロTFのオートフルオログラムを示している。レーンAは、DTTによる遺元を伴う、電気泳動したパットラベル化AuTFを示している。レーンBは、遺元なしで電気泳動した同サンブルを示している。

第7回は、15%アクリルアミドゲル中で電気体助した、因子 VI/VI a の観和性で早難した h u TFのオートフルオログラムを 示している。単糊、\*\*\*! によるラベル化、還元及び脱グリコシ ミノ来郊からカルホボキシ末泊の方向で、ヒトの組物因子宣復タンパク質の成熟型及び和駆体(各々、huTFh及びブレheTFh)の完全なアミノ放残器配列は、1番から263番に対応する。マイナーな成熟型タンパク質のアミノ放残器配列は、1番から263番に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ放残器の始まり、263番の残器で持わる。成熟プロセスではまされるリーダー配列(前駆体領域)に相当するアミノ放残器配列は、マイナス番号で示した。細胞外ドメイン及びトランスメンブレン・アンカー領域は各々、部位3~219及び220~242に対応する。第2図は、1文字ヌクレオチド塩基コードを用い、左から右に5、末端から3、末端の方向で、プレカェアトト及びトロアトトクンパク質をコードする、cDN人のスクレオチド配列を示している。トェアトの構造遺伝子は塩基130から始まり、塩基918で終わる。

その読み枠は、各アミノ酸を示す!文字を、対応するコドンの 中央の塩蓄上に置く中り方で、ヌクレオチド配列の上に推察され るアミノ酸強器を付置することにより示した。

第3回は、例2で説明されている、カェTPの凝血活性を測定するのに用いる、減無値定を示す回である。同対数プロットは、 かとミリリットル当りのピコグラムで表わしたとトの組織因子 (AuTP) 温度で示される、ヒトのクエン酸化血療凝集(発血) 特間を示したものである。

第4回は、10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、 因子WI/WI=親和性で単謀したhuTFhのオートフルオログラ ムを示している。レーンAは、別4で説明されているように、単 離され、電気泳動前に、ジチオスレイトール(DTT)で連元したい。

ル化は、例もで説明されているように行った。レーン1は、キロダルトンで扱わされた見かけ上の分子量をもつ複博物質として電気泳動したタンパク質複博物質:リゾチーム、14.3;カルギニック・アンヒドラーゼ、30.0;オバルブミン、46.0;ウシ直清アルブミン、69.0;ホスポリラーゼも、92.5;ミオシン、200.0(ナペエ」し州、アーリントンハイツ・アマーシャム社より入手)を示している。「\*\*!ートロTFを含むサンブルをDTT存在下(レーン2及び3)又は非存在下(レーン4及び5)で電気泳動した。これら「\*\*1ートロTP合有サンブルのいくつかは電気泳動前に反グリコシル化し(レーン3及び3)、他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び4)。

レーン3及び5に流した・・・・1 - huTF含有サンアルは、電 気味動前に脱ゲリコシル化され、レーン2及び4のものは脱ゲリ コシル化しなかった。

第8図は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で質気泳動した、免疫類和性で早期されたheTPのオートフルオログラムを示してい。レーン1は、キロダルトンで表わされる見かけの分子量をもつ、マーカーとして質気泳動した選博クンパク質;チトクロムC、12.4:ラクトグロブリン、18.4:カルボニック・アンヒドラーゼ、29.0:ラクテート・デヒドロゲナーゼ、36.0;オパルブミン、43.0:グルクメート・デヒドロゲナーゼ、55.0;及びホスホリラーゼト、95.5(全て、MA州ニュートンセンターのディパーシファィド・パイオテク(Diversified Blotech.)から入手した)を含んでいる。レーン2は、スミス(Seith)等のBCAタンパク質検定法(アナリティカル・パイオケミストリー(Apal. biochem.)150色、76~85頁(1985年))を用いて測定し、かつDTT

-- 540 - 12:-

を用いて還元した約20 μgのタンパク賞を含んでいる。buff 遺鍼(huffh)は、明らかに、およそ47 Mrの位置に路辺 され、huff链線は、およそ125 Mrの位置にわずかに確認 された。タンパク質は、レムリ(Lacanli)(ネイチャー(Mature)、 227巻、680~685買(1970))の報告に従がい、コ マージ・ブルー染色により可復化した。

第10図は、huTPhのリン酸質化した(酸質化した)ポリペプチド類似物による、huTP由来のみ集開効配容に関する投与一応答曲級を示すグラフである。その風容率は例9で説明されているように、頭方性により、回頻似物に対して限定した。

第11図は、組換えDNAプラスミドゥCTF66、pCTF314及びゥCTF403内のEcoRI断片神入物の制限地図を示したものである。その神入物(一一)は、プレトロTF1選 伝子の完全なダクレオチド配列に対応する重複するヌグレオチド配列領域を示している。別に、その挿入物は、第2図で示されている、残器1~486(pCTF64に含まれている)、残器1~35~775(pCTF803に含まれている)、及び残器176~1125(pCTF403に含まれている)由来のヌクレオチドに対応するヌクレオチド配列を、左から右に5~から

例19に述べられているように測定した。白丸(O)はTP8-5G9抗体を示し、馬丸(●)は無関係の抗体を示している。

第16図は、抗Tドモノクローナル抗体TF8-5G9による特製したヒトの脳TFの凝血活性の阻害を示している。リン腺質ベングル中に再構成された、特製したヒトの脳TFの凝血活性は、種々の濃度の特製18Gと、37c30分間、前処理した後別定した。丸は、抗TF抗体TF8-5G9に対するもので、三角は、無関係なコントロール抗体PAb100に対するものである。データは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わされている。

第17図は、特製した抗丁ドモノクローナル抗体で処理した、 特長されたJ82勝繋が人物物に対する服害因子なの結合及び、 その細胞による因子メェの形成を示している。因子メェの形成率 の服害の値は、三角で表わされ、因子なの結合阻害の値は、丸で 表わされている。データは、抗体を加えないでインキュペートし た細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パ ネルムは抗体丁ドリーをこくの効果、パネルBは、抗体丁ドリー 587の効果を示している。

第18回は、例25で述べられているような、免疫観和性で早期した h u T P のウェスタンプロット分析を示している。15%ポリアクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン1は、キロダルトン(k)でベネル人の左に示された見かけの分子費をもつ分子量領域が含まれる。レーン2は、電気水動剤に選元された、特製とトヘモグロビン1月8を含んでいる。レーン3は、単雄したhuTPを電気泳動剤に選元したもの0.5月8を含んでいる。レーン4は、非選元の、早期されたhuTP0.5月8を含んでいる。レーン4は、非選元の、早期されたhuTP0.5月8を含んでいる。SDS-PAGB後、生じたタンパク質パンドを電気

3 ・の方向で含んでいる。また、例 1 6 で述べられている機 \* の 超換え D N A 分子を構築するのに用いられた神人物内の制限酵業 切断部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示 されるリーダーペプチド ( ) 及びトランスメンプレン・ア ソカードメイン ( ) をもつプレト u T P h タンパク質のお よその位置も示してある。

第12図は、huTPhの非リン設質化(非設質化)ポリペプチド競協物による、huTP由来の凝集開始の阻害を示す、役与一応答曲級のグラフである。モル構度で変わした様々の機度の非設質化ポリペプチドによる凝集の阻害率(光)は、例12に述べられているように測定した。試験したポリペプチドは、p24-35(△)、p26-49(○)、p152-169(□)及びペプチドp40~71、p72~104、p94~123及びp161189であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、集物的に異丸(●)で示した。

第14回は、huTF由来の最低の抗huTF放体による国客 の投与一応答を示すグラフである。はその機度の抗huTFモノ クローナル抗体TFB-5G9による最集の図書率(54)は例 19に述べられているように制定した。

第15図は、huTP理がヒトの純維芽細胞系列GM1381の細胞玻璃物である、huTP由来の凝集の、抗huTP抗体による顕著の投与一応答のグラフである。種々の浸度の抗huTPモノクローナル抗体TF8-5G9による凝集の顕音率(%)は、

決動的にニトロセルロースに移した。このようにして作ったウエスタン・ブロットを0.2 μg/mlの観和性複製したウサギ流 トロTF IgG (パネル人)、1 μg/mlのサギ流へモグロビンIgG (パネルB) 又は、1 μg/mlの非免疫ウサギigG (パネルC) と免疫反応させた。免疫染色したパンドの見かけの分子量を右に k D m で示した。

## 発明の詳細な説明

## A、定程·

アミノ改;ここで同定される全てのアミノ改は、天然のレー型のものである。標準的ポリペプチド命名法に徒がい(ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、243 巻、3557~59頁(1969))、アミノ放残落の時号は、次の関令表に示されているとおりである。

好 応 表

			•
Si	号		・ アミノ政
1文主	3文字		•
Y	Туг		チロシン
G	Gly		グリシン
P	Phe		フェニルアラニン
м	Met		<b>メチオニン</b>
A	Ala		アラニン
s	Ser	•	セリン
L	1.10		イソロイシン
L	Leu		ロイシン
T	Thr	•	えレオニン
· v	Vai		<b>メリン</b> ・
P	P = 0		プロリン

ここでは、全てのアミノ酸配列は、従来どおり左から右に、アミノ故未端からカルボキシ末端への方向で示されていることに注意を要する。さらに、アミノ改残器配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH(水素及び水散器)のようなラジカルへの結合、もしくは、ポリペプチド頭における1から約15残器の1つ以上のアミノ改残基配列を示している。

ポリペプチド及びペプチド;ポリペプチド及びペプチドはここでは、時合う残器のアルファアミノ器とカルポキシル器の間のペプチド結合により互いに直鎖的に結合した、わずか約50アミノ設残器を意味するものとして互換的に用いられている。

クンパク質: タンパク質は、ポリペプチドのように互いに直取的に結合した50以上のアミノ政務器を意味して用いられている。 スクレオチド: 糖部分 (ペントース)、リン酸及び窒素へチロ環塩基からなるDNA又はRNAの単量体ユニット。この塩基はグリコシド炭素 (ペントースの1′炭素)を介して糖部分と結合しており、塩基と糖の組合せはスクレオシドと呼ばれる。スクレオシドがペントースの3′又は5′部位に結合するリン酸基を含

パク質をコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断 片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はhuTFh又はプレhuTFhタンパク質中にあるアミノ酸残器をコードする各コ ドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロ ンを含まない遺伝子であることが好ましい。

使って、第2回に示される、5、末端の約130番から、3、末端の約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、h u I P h を発現することができるDNA断片が本発明の1組線を構成している。第2回に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、プレト u T F h を発現できるDNA断片が、本発明のもう1つの組織を構成している。

好ましい、可溶性のトuTPト分子は、トuTPトをコードするDNAの5、末端の約150塩苗によってコードされるアミノ酸残益を欠いている。提って、第2回で示される、5、末端の約130番から約756番を極由して、3、末端の約801番の部位までの配列を基本的に含み、かつ、可溶性のトuTPトを発現できるDNA断片は、本発明のさらに好ましい超機を構成する。可溶性のトuTPト請適遠伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2回で示されている、約130番から約756番約130番から約771番、約130番から約786番、及び約130番から約801番で表わされるスクレオチド配列を有するものである。

可溶性プレトロTFトをコードする、好ましいDNA断片は、 それらが、第1回で示されるように、一32番から0番までのアミノ放残基で示されるような、アミノ末端リーダー配列を含むタンパク質をコードしていること以外は、可溶性カロTFトをコードしているものと同じである。従って、可溶性プレーカロTFト 平成 7.12.20 発行

むとき、それをヌクレオチドと呼ぶ。

塩基対(bp);二本額DNA分子内でのアデニン(A)とチミン(T)又はシトシン(C)とグフニン(G)の組合せ。 B. DNA所片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ鼓配列は 遺伝子コードを介して、モのタンパク質をコードする構造遺伝子 のデオキシリポ核数 (DNA) 配列に直接関係づけられる。従っ て、構造遺伝子は、モれがコードするタンパク質又はポリペプチ ドのアミノ酸残器配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コートの性質にリダンダンシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのフミノ酸に対し、1つ以上のコードするスクレオチド・トリプレット(コドン)が、1つのアミノ酸残器をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ酸残器をフードするのようなスクレオチド配列が存在することになる。そのようなスクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ酸残器配列を生産することが可能なので、機能的には等価であると考えられている。場合によっては、ブリン又はビリミジンのメチル化物がスクレオチド配列の中に超込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重複クンパク質(huffh)をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい越換において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重額前額体クンパク質(プレカロTFh)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、huTFh、また、より好ましくは、プレーカロTFhの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可溶性のhuTFh又は可容性のプレーhuTFhタン

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、 落本的に、第2回で示されている5、末端の約34番から756 香を経由して、3、末端の約801番で示される配列を含んでい る。典型的な好ましい可溶性のプレルロTFAコードのDNA断 片とは、第2回で示されているところの、約34番から約756 素、約34番から約771番、約34番から約786番及び約 34番から約801番のスクレオチド塩基配列を有するものであ

可得型も含めて、上配トuTF N及びプレトuTP Nタンパク 質をコードする相同的 DNA及びRNAも先に掲拾したように考 落された。

トuTFト及びプレトuTFトをコードするDNA筋片は化学的技術、例えばマテウシ(Hatteucci) 等のホスホトリエステル法 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Aa. Cham. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成できる。 (ここで引用されている技術の公開は参考として組込まれている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ競技基配列をコードする代りに通当な塩基を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし羽2図に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的にトロTF及びプレトロTFトタンパク賞をコードする保護遺伝子を含むDNA断片は、これらの遺伝子を含む 担僚人DNA分子から得ることができる。例えば、プラスミFタイプの組織えDNA分子pCTF64、pCTF314及びpCTF 403はいずれらトロTFト及びプレトロTFトタンパク賞の異なる領域をコードするDNA配列を含んでおり、また、これらを 合せると、各タンパク質を発現するのに必要な全てのDNA配列を有することになる。各々、pCTF64、pCTF314又はpCTF403でトランスホームした大陽道の培養物は、1987年3月27日、アグペスト協定に基づき、MD州、ロックビル、パークローン、ドライブ12301番、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受理番号67370、673.68及び61369が割当てられた。

AuTPA又はプレカuTPAをコードするDNA配列を含むDNA断片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの適当な制運断片を機能的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発明のDNA分子は、枯着末端、すなわちこの分子の二本領領域を越えて伴びた。突き出した。一本領領域をもっている。本発明のDNA分子上に枯着末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なり求核酸(RNA)も考定している。

## C. 組換えDNA分子

本発明の超換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクター に機能的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、 \*ベクター \* という言葉は、 細胞中で自己複製できるDNA分子で、 別のDNA断片を複鍵的に結合することができ、 その結合した断片の複製をもたらすものを意味する。 h u T F h 及びプレ h u T F h 遺伝子の発現を同ることができるベクターは、ここでは \*発現ベクター \* と呼ばれる。従って、 退換えDNA分子 (r D N A) とは、 天然においては 週 常一緒にいることはない少なくとも 2 つのヌクレオチド配列を含むハイブリッドDNA分子のことである。

パイオラド・ラボラトサーズ社)及びgPL、gKK223(NJ 州、ビスカタウェイ、ファルマシア社)がある。

真抜知助、好ましくは脊椎生物和助と適合する発現ベクターも、本発明の組織えDNA分子を作るのに用いられる。真核和助発現ベクターもこの分野でよく知られており、敗社から市販されている。典型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿入に便利な制限部位を含んでいる。これらのベクターの典型的なものには、pSUL及びpKSV-10(ファルマシア社)、pBPV-1/pML2d(インターナショナルバイオテクノロジー社)及びpTDT1(ATCC、#31255)がある。

好をしい腔様において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる真体性相散発現ペクターは、真体性細胞中で効果的な選択マーカー、好ましくは、凝剤耐性選択マーカーを含んでいる。好なしい剥削性でマーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo) 遺伝子である。サウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Noi. Appl. Genet.) 2 巻、3 2 7 ~ 3 4 1 頁(1 9 8 2 年)。

本発明の r D N A を作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考案されている。ここで用いられているように、\*レトロウイルス発現ベクター\*とは:レトロウイルスゲノムのロング・ターミナル・リピート (LTR) 領域由来のプロモーター配列を含む D N A 分子を意味する。

好ましい起機において、食型的な免現ベクターは、真核細胞中では複製不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスの構築と使用法は、ソージ(Sorge)等により報告されてい

本発明のDNA断片を機能的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの機能的性質及びトランスホームされる宿主知識などが延慎入DNA分子の構築技術の上で本質的な問題となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに機能的に結合しているDNA断片中に含まれるカェTPト又はプレルェTPト遺伝子の、少なくとも複製を、好きしくは発現をも可能にする。

好ましい競技において、本発明により考案されたベクターは、 原核性のレブリコン、すなわち、パクテリア宿主知殿のような原 技知的中の、これをトランスホームした数色体外退費えDNA分 子の自己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。こ のようなレブリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、 原核性レブリコンを含むこれら監検は、これをトランスホームし たパクテリア宿主に取幇別性を与える遺伝子も含んでいる、 典型 的なパクテリアの取割耐性遺伝子は、アンビシリン又はテトラティクリンに対する別性を与えるものである。

頭核性レブリコンを含む、これらのベクターは、これをトランスホームした大路間のようなバクテリア宿主細胞中で、be7Fb 又はプレトuTFh遺伝子を発現(転写及び翻訳)させることができる原核性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列でで含た発現コントロール要素である。バクテリア宿主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、本発明のDNA断片の挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクタープラスミドの真型的なものには、pUC8、pUC9、pBR322、pBR329(CA州、リッチモンド・・

る(モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(Sol. Cell. Biol.) (地、1730~37頁(1984年)。

相材的なホモポリマー末端を介して、DNAモベクターに機能的に結合する多くの方法が開発されてきている。例えば、相補的なホモポリマーを、挿入するDNA断片及びベクターDNAに付加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相構的ホモポリマー末端間の水気結合で結合し、組換えDNA分子を作る。

1つ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNA断片をベクターに結合するもう1つの方法を提供する。先に報告されているように、エンドヌクレアーゼで制限消化することによって生成したDNA断片を、3°-5°・エンドヌクレアーゼ活性で突出落をで、人間大き、一本技术協を除き、また度合活性で、人は人だ3°・末端を記録するのは、イクテリオファージTADNAポリメラーゼは、大腸面のNAポリメラーゼーで処理する。従っている。こののではない、平滑末端DNAがよりオラージーンのないである。ことができる。は、不分のような反応でもの未満にポリリンカーをもつのNA断片をできる。さらにこのDNA断片を遭当な制限酵素で切断した発見ベクターとライゲーシェンする。

多種の耐悶エンドスクレアーゼ節位を含む合成リンカーは、 CN州ニューヘブン、インターナショナル パイオテクノロジー 社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換え·DNA分子と等価なRNAも考案して

いる。

D. トランスホームした細胞と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好をしくは可容性のhuTFhを発現できるrDNAでトランスホームした宿主細胞にも関連している。この宿主細胞は、原核性でも資格性でもよい、ベクテリア細胞は、原核宿主細胞であることが好をしく、また典型的には、ND州ベセスダ、ベセスダ・リサーチラボラトリース社から入手できる大陽面DHS様のような、大陽面の株である。好をしい真体性宿主細胞には、イースト及び木乳類細胞、好をしくはマウス、ラット、サル又はヒトの協理芽細胞系列のような特性動物細胞が含まれる。好をしい真体性宿主細胞には、CCLSIとしてATCCから入手できるドーイスマウス胚細胞がある。

本発明の組換え DNAによる適当な細胞宿主のトランスホーメーションは、典型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原体性宿主細胞のトランスホーメーションに関しては、コーエン(Cobeo) 等のプロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Hatl. Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年);及びマニアチス(Haniatia)等のNY州コールド・スプリング・ハーパー・コールド・スプリングハーパー・ラボラトリー、ラボラトリー・マニュアル、モレキュラー・クローニングを参照せよ。符佳動物細胞の「DNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスホーメーションに関しては、例えば、ソーツ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(Hol. Call. Biol.) 4巻、1730~37頁(1984

プレトuTFト抗環性を示すタンパク質、またさらに好ましくは、 生物学的に活性なトuTFトを含むことが望ましい。

トランスホームした宿主組制を培養するのに有用な栄養培地は 当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市 版されている。宿主超散が水乳質細胞であるような庭様において は、『無血清』培地を使うことが望ましい。

E. huTFh及びプレhuTFhタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、huTFh抗原性を示すタンパク質の生産方法がある。huTFh抗原性を示すタンパク質は天然の組織因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質である。huTFh抗原性を示すタンパク質は、抗原として有用であり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明の診断システムや診断法で使用することができる。

年)、グラハム(Graham)等、ウィロロジー(Virol.)。5 2 巻、4 5 5頁(1973年);及びウィグラー(Pister)等、プロシーディング・イン・ナショナル・フカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nati. Acad. Sci.)USA、7 6 巻、1373~7 6頁(1979年)を参照せよ。

うさくトランスホームされた相談、すなわち、本発明の超点人DNA分子を含む相談は、従来の方法によって同定することができる。例えば、本発明の「DNAの導入から生じた相談をクローン化し、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから相談を収穫し、将解し、そのDNA内容物について、サウザーン(Southern)(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J, Bol, Bjol, )98巻、503頁(1975年)又は、ペレント(Borent)等(パイオテクノロジー(Biotech.)3巻、208頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、その「DNAの存在を描べた。

TDNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホーメーションは、そのTDNAがAuTFA又はプレAuTFAを発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ベクターでうまくトランスホーメーションできた細胞は、AuTFA又はプレAuTFA抗原性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞状料を収穫し、本発明のハイブリドーマによって生産される抗原等に伸減的な抗体を用い、AuTFA又はプレAuTFAを検定する。

このように、トランスホームした宿主部胞それ自体に加え、本発明は、栄養培地中のそれらの細胞の培養物好をしくは、モノクローナル (クローン的に均一な) 培養物、又は、モノクローナル (冷極物由来の原養物も含ました。この培養物は、カロTPト又は

パク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質合有面分の分面が含まれる。例えば、タンパク質の分面に対して知られているゲル違過法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに刻するものが、培養物中にある発現タンパク質の早間に用いることができる。さらに、免疫観和性、免疫吸着やそれに刻するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

F. huTFh及びプレトuTFhクンパク質組成物と発現度物本発明は、また本発明の「DNAのhuTPh及びプレhuTPh及びプレトロTPh及びプレトuTPh発現度物は第1図で示されている。好ましい起機において、huTFh及びプレトuTPh発現度物は第1図で示されているように、各々残蓄1から263及び-32から263に対応するアミノ及残器を有している。その発現タンパク質は、第1図で示されるプレトuTPh及びhuTFhのアミノ放残器を列の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが設ましい。

別の監機において、可溶型のトロTFト及びプレトロTFトと、可溶性トロTFトモして、または可溶性プレトロTFトを合む組成物も考案されている。ここで用いている。可溶性。という音楽は、未来のトロTFト及びプレトロTFト分子の相能外ドメイン、すなわち、第1図に示すところのTミノ来増から残器220までの、トロTFト及びプレトロTFト分子で意味する。それゆえ、可溶性トロTFト及び可溶性プレトロTFトは、本来の分子で形成されるトランスノンブレン・アンカー領域の変質的部

分(第1回で示すところの残差220から242)を含まない。 ここで用いている。huTPh。及び。プレhuTFh。という 甘葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可容型を 含んでいる。

好ましい可得性トロTPトタンパク質は第1回で示されているところの、アミノ末端の残益約1番から、209巻を経由してカルボキシ末端の残益224番で示されるアミノ放残益を示している。 従って、好ましい可能性トロTPトタンパク質は第1回で示すところの約1番から約209番、約1番から約219季及び約1番から約224番の残疾で表わされるアミノ設残基配列を有するものである。

好ましい可溶性プレカロTFトタンパク質は、第1回で示すところの、アミノ末崎の一32番から、209番を経由して、カルボキシ末端の224番の残器で表わされるアミノ鼓残器を有している。従って、好ましい可溶性プレカロTFトサンパク質は、第

下、血管系液状サンプルを凝集する能力を意味する。凝集能力を 検定するのに十分な、異型的 h o T F h タンパク質速度は、例 2 におけるサンプルノ h u T F h 比と同じ比を用いたとき、約 0.1 p g / m g から約 1 0 0 n g / m g、好ましくは、約 1 p g / m g から約 1 0 p g / m g 、 そしてより好ましくは約 1 0 p g / m g か ら約 1 n g / m g で ある。もちろん、凝集能力を検定するときに 必要な濃度よりも高い濃度であるが、好ましい濃度に発収しうる h u T F h 溶液も考慮されている。

好さしい酸様において、huTFh含有水溶液は、リン脂質又は非イオン性异面活性剤中に分散されたhuTFhを含んでいる。 典型的リン脂質:huTFhタンパク質質量比は、約5:1から 12000:1、好ましくは、約50:1から約5000:1そ してさらに好ましくは、約100:1から2500:1の範囲で ある。

## C. ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ政残器を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残器を含んでいる。さらに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ政務を配列及び新しい機能特性を特徴としている。

従って、本発明のポリペプチドの1つの監視は、血液凝集因子 オグリョへのトロアドルの結合を競合的に阻害する能力をその特 散の1部としている、トロアドル結合部位ポリペプチド類似物で ある。本発明の結合即位質収物は活性化した複合体を作ることな く、すなわち、砂葉を開始することなく因子リブリュに結合する ことが望ましい。

ここで用いている。複合体。という言葉は、抗原~抗体又は、

平成 7.12.20 発行

1日で示すところの約~32番から214番、約~32番から 219番、及び約~32番から約224番の残益で変わされるア ミノ放残器配列を有するものである。

1つの整様において、huTFh及びプレhuTFL角座物は グリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のrDMA でトランスホームした原体和的中で生産される。

非グリコシル化型のトロTPト及びプレドロTPトは、本発明の接種物及び診断システムにおける免疫原及び抗原として有用である。

典型的には、真核細胞で生産されたトロTPト及びプレhuTFhはグリコシル化されており、また抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、"生物学的活性"という時句は、因子はブロロの依存の凝集を誘導する地力をもつトロTFト又はプレトロTFトタンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子軽額タンパク質を含まない生物学的に活性な h u T P h を含有する水溶液を含む額成物を考案している。その組成物も実質的に例えばラウリル硫酸ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びS D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(S D S - P A G E)で満定される約、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが望ましい。

水溶性のhuTFh含有溶液は血液又はクエン酸化した血漿のような血液由来の虚物のような血管系波状サンプルの環境能力を検定するのに十分な生物学的に活性のあるhuTFLを含んでいる。 「 森集能力 。 という語句は生物学的に活性なhuTFLを在

レセプターーリガンド反応のような特異的結合反応の度勢を意味 している。代表的複合体としては、免疫反応運動及びここでTFI VI/VIaと示されているところの超液因子一因子VI/VIa結合反応度物がある。

好ましい態機において、huTPh結合部位類似物は、少なく とも第1図に示されている30~35番のフミノ設殊器を表わし ている次に示すアミノ政務基配列;

- V N O V V T -

を含んでいる。

さらに好ましくは、カロTFA結合部位類似物は、少なくとも、次のフミノ強弾基配列:

- V N Q V Y T V Q I S T - 及 U

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30~4.0及び 155~167番の、huTFhのアミノ酸残落を示している。

さらに一層好ましい場合は、 h u.T.P. h 結合節位類似物は第1 図で示すところの、各々26~49 香及び146~167 番で表 わされている、次のアミノ放残器配列;

- EPEPANO VYTVO ISTESEONESEC - . AU

- ALCKOFIALFARK2222CKK1 - \*

からなる罪から選ばれたアミノ破残基配列を含む。

好ましいhuTPh結合部位ポリペプチド類似物は第1支で示されているアミノ政務委屈列を含んでいる。

### 第1裏

## 3 称\*・・・アミノ放送益配列

	•
p24-35	H-EKEPKPVNQVYT-OR
p26-49	H-EPKPVHQVYTVQISTKSGD#KSKC-OH
p144-159	H-RDVFGKÖLITTLYYKK-OH
p146-167	H-VFGKDLIYTLYYWXSSSSGXXI-OH
p159-169	H-IYTLYYWRS5SSGKXTAK-OH
P157-169	H-YWKSSSSCKKTAK-OH
p161-189	H-855CKKTAKTHTHEFLIDVDKGEHYCFSV-O

a. 各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ 数残器配列を変わしている。

ポリペプチドp26~48、p146~187及びp161~ 1896、抗AuTPA抗体分子がAuTPAに結合するのを中 和(競争的配答) する能力を特徴としている。抗AuTPA抗体のAuTPA、の部合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2度に示されているものである。

## 第 2 表

# 名 称 アミノ散表基配列 p1-30 H-SGTTHIVAAYHLTWSIHIKTILEWEPKPV-OH p40-71 H-TXSGDKSKCFYTTDIECDLIDEIVKDVXQTY-OH p41-49 H-KSGDKSXC-OH p56-71 H-LCDLIDEIVKDVKQTY-OH p72-104C<sup>2</sup> H-LARVISYPAGHVESTGSAGEPLYEMSPETTPYLC-OH p94-123 H-YENSPETTPYLETHLGOFTIOSFIGOGTEV-OH

H-QAVIPSRIVNRKSTDSPVEC-OH

a. 実験名に付けられた。C。は、タンパク質結合のためのリ ンカーとして、示されている配列に付け加えられたシスティ

p190-209

れる。リンキングに使われる典型的アミノ政残器は、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに 類するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、末端別。 基アシル化、例えばアセチレーション又はチオグリコン酸アミデーション、ターミナルカルボキシアミデーション、例えば、アン モニア、メチルアミン、その他により配列が旋動を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリャー・ハブテンのように、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリヤーとの結合の場合、本発明のポリペプチドは、hu TFh と免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみて、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペプチドの抗原的に関連したベリアントも考案している。 \*\* 抗原的に関連したベリアント とは、第1表もしくは第2表のポリペプチドの、少なくとも6個のアミノ酸残器配列領域を含み、かつ、第1表又は第2表のポリペプチド及びhu TFh と免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、トロTFト結合部位ポリペプチド類似物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考案している。 典型的なリン脂質:ポリペプチド重量比は、約5:1から200:1、好きしくは約30:1~80:1、さらに好ましくは、約45:1~55:1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに適している好ましいトロTFト結合部位類似物をセクション目の第4表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野ではよく知られているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多くの技術のすぐれたまとめは、J. B. スチワード (Steward ) 及び

ン残器を示している。

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子をグリュへの結合に対し、本来の組織因子と試合でき、そして、または、h u T P h に対する抗h u T P h 抗体分子の結合を懸合的に顕著しうるかぎり、h u T P h の アミノ 改設 盗配列と同一である必要がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず挿入、欠失及び運換のような複々の変化を与えることができる。

保存的電域には、あるアミノ放残器が他の生物学的に同様の残 器に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、 パリン、ロイシン又はメチオニンのような破水的残器間の置換又 は、アルギニンとリジン、グルクミン数とアスパラギン酸又はグ ルタミンとアスパラギン及びそれに鎖するもののような医性残器 間の置損がある。また。保存的置換。という語句には、もし、ポ リペプチドが、必要とされる結合活性を示すならば、未置換の元 々のアミノ酸の代りに、置換されたアミノ酸を置いることも合定 れる。

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的で換をしているために、本来の h u T P h の配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリヤーにうまく固定する。リンカー。を提供する目的で、その各末端に付加的残蓄をつけ加える場合は別にして、アミノ酸 残蓄の通常せいぜい約20パーセント、より普通には、せいぜい 10%が置換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリヤーは以下に述べる。

通常、アミノ酸残益リンカーは、少なくとも1残益であり、また40以上の残益のこともあり、しばしば1~10残益が用いら

J. D. ヤング (Young ) の 面相 ペプチド合成 (1969年、サンフランシスコ、N. B. フリーマン (Freeman ) 社) 及びJ. メイエンホーファー (Helephofer) の ホルモン性タンパク質及びペプチド (1983年、アカデミックブレス社 (ニューョーク)、2 密、46頁) が固相ペプチド合成について、また6.シュローダー (Schroder) とK.クブケ (Yubke) の ペプチド (1965年、アカデミックブレス社 (ニューョーク) 1 巻) が古典的な淑相伝について行なわれている。

## B.接種物

別の規様において、本発明のポリペプチド又は、その抗原的に関連したパリアントは、生理学的に許容しうる水性特象剤組成物として、その効果的量が投与された時、AuTFAと免疫反应する抗体を誘導することができる接種物となる。 種々の文法型の・接 独物・という語は、AuTFAに対する抗体の調製に用いられる活性成分として、本発明のポリペプチドを含む組成物として、ここで使用されている。ポリペプチドの抗体を誘導するのに用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体としてキャリヤーと結合して、又は、ポリペプチド重合体として用いられるのであるが、表現の簡便性のため、本発明のポリペプチドの種々の遺様は、金て、・ポリペプチド・という語及びその種々の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約35以下のアミノ登録器を含むポリペプチドに対し、すでに 記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリヤーに結 合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してまたように、1つ以上の付加的アミノ酸残るをポ リベプチドのキャリヤーへの結合を助けるため、そのポリベプチ ドのアミノ又はカルポキシ末端に付加することができる。ポリベ

平成 7.12.20 桑

プチドのアミノ又はカルボキシ末端へ付加したシスティン残菌は、シスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調整の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応虚物、グルタルアルデヒドのようなジナルデヒド(クリプスタイン(Klipstela)等(ジャーナル・オブ・インフェクシャスデシーズ(J. Inpect. Dis)、147巻、318~3.26頁、(1983年))及びそれに関するものの使用、又は、キャリヤーに対し、アミド結合を生ずる、水消性カルボジイミドの使用ような、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能基を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス(&erameas)等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Scand. J. Immanol.)8巻、補1、7、7~23頁(1978年)を参照せよ。

有用なキャリヤーは、当分野ではよく知られており、一般的にはタンパク質でのものである。そのようなキャリヤーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン(XしH)、エアスチン、チログロビン、子ウシ血清アルブミン(BSA)やヒト血清アルブミン(HSA)のようなアルブミン類、ヤギ赤血球(SRBC)のような赤血球類、テタナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ(Dーリジン:Dーグルタミン設)のようなポリアミノ酸及びこれに鎖するものがある。

キャリヤーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存してお り、本発明に特に関係しない基準に基づいている。 例えば、接接 される動物中で不都合な反応を起こさないキャリヤーが選択され もべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリヤーに結合した結合物

びイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はパラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイムノグロブリン分子、実質的に本来のものと同じイムノグロブリン分子及びFab、Fab、、F(ab\*)。及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、パラトープを含有する、イムノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、h u T F h 及び本発明の特異的ポリペプチドの少なくとも1つと免疫反応を起こす抗体分子を含むことを特徴とする抗ペプチド抗体である。

例えば、huTFh及び組織因子結合部位のポリペプチド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組織因子が因子リノルaと結合する能力を中和である。従って、好ましい抗体組成物は、huTFh及びp26-49又はp146-167と反応し、かつ、p204~226と実質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。huTFhに対して生ずるポリクローナル抗血液は、p204-226免疫反応する抗体を含むことに住意すべきである。このように、抗204-226免疫反応性が実質的にないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生産は、本乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有するよ乳類抗体分子を誘導することによって行なわれる。さらに、その抗体分子をそのホ乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような従来技術によって、その必要量を早離する。このように生産した抗体組成物は、なかんずく、は断法及び身体チンプルにおけるhuTPhを検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

として、効果的な免疫原量の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当りの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物種、その動物の体重及び選択した接種レジメンに依存する。異型的に、接種物は、接種(投与)当り約10マイクログラムから約500ミリグラム、

好ましくは、約50マイクログラムから約50ミリグラムのポリペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている。単位投与。という語句は、各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリヤー又はピヒクルと共に望ましい免疫原的効果を座むのに必要な予め決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に通した物理的に分離した単位を意味する。本発明の複種物の新しい単位投与に関する明細は、凶活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学的効果、及び凶ここで幹細に公開されている動物中での免疫学的使用に内在する制限により以明され、かつ直接依存しており、これらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸酸街食塩水などの生理学的に許容された(受容できる) 器駅割中にボリペプチドー 結合体を分散させることにより、乾燥した固体のボリペプチド結合体から水性組成物を調整することができる。

また、接種物は希収剤の一部として、アジュパントを含んでいる。完全フロイントアジュパント (CFA)、不完全フロイントアジュパント (IFA)及びミョウパンのようなアジュパントは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されてい

## 1.抗体及び抗体组成物

**積々の文法型の"抗体"という路は、イムノグロブリン分子及**「

モノクローナル抗体組成物も、本発明で考案されている。 後出 関昇内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的に h u T P h を 結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を含んでいる。 従って、典型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それがh u T P h 以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえまんでいたとしても、 h u T P h への結合観和性を示す。ひとつの監備において、モノ クローナル抗体組成物は、 h u T P h 及び、組織因子結合部位の ポリペプチド類似物、好ましくは p 2 5 ~ 4 9 又は p 1 4 6 ~ 1 6 7 と免疫反応する抗体分子を合んでいる。

他の組様において、本発明は、huTPhと免疫反応し、 huTPhにより開始する環境を阻害する抗体分子を含む抗凝集 (中和) MoAbを考案した。さらに凝集を阻害する好ましい MoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、huTPh結合部 位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示され ているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の扇標において、抗凝集MoAbは、huTFA及びhuTFb: 因子は/VI a の複合体と免疫反応し、huTFAによって開始する發展を阻害(中和)する抗体分子を含んでいる。さらに、好ましい抗凝集MoAbはhuTFhポリペプチドp1-30又はp26-49と免疫反応することを特徴とし、またこれは、huTPhポリペプチドp56-71と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、退機因子の転換を開始する能力を中和しない 抗体分子を含む非中和性モノクローナル抗体退成物も考案した。 そのような超成物は、 h u T F h 及びポリペプチドゥ 1 - 3 0 と 免疫反応し、かつ、ハイブリドーマT F 9 - 1 0 H l 0 により生 強(分泌)される抗体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクコーナル抗体組成物は、適当なよりペプチド符

異性をもつ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培 地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始すること によって生歴することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分泌するのに 十分な象件及び時間、培養を被持する。それから、抗体を有培地 を収集する。さらにこの抗体分子を従来法により卓越する。

これらの組成物の調製に有用な特地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されていて、合成培養培地、同血は緊視マウス及びそれに類するものが合まれている。代表的合成培地は、4.5g/gのグルコース、20mグルタミン及び20パウン胎児血清を補足した、グルベコ最小培地(DMBM:グルベコ(Dolbecco)等、ヴィロロジー(Vivol)、8巻、396頁(1959年))である。代表的同血繁殖マウス株はBelb/cである。上述の方法で生産したモノクローナル抗体組成物は、例えば、huTPh合有免疫反応の形成が必要である、は断及び治療法で用いることができる。

1.ハイブリドーマ

本発明のハイブリドーマは、トロTFトと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴とする。さらに、好ましいハイブリドーマは、トロTFトで開始する破坏を阻害し、また、望ましくは、木発明のポリペプチド、好ましくは、ドロTPト結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1表に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴としている。さらに好ましい脂様においては、抗凝集Mo人bは、非ヒト、異長額、TFと免疫反応する。

他の好ましい態後において、本発明のハイブリドーマはbulph 及びカuTPカ:因子ロノロンの複合体と免疫反応し、buTFカ

Wai複合体形成過度の減少によると考えられている。従って、生体内において、huTPh因子W/Wa結合部位ポリペプチド類保物の投与は、磁集やある炎症反応のような、組織因子の因子W/Waへの結合により開始する生理学的応答を調節するのに用いることができる。好ましい監機において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン脂質中に分散して投与される。

他の股機において、本発明のMoAb、抗弱類MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗腫瘍状薬に結合し、抗腫瘍治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗腫瘍治療組成物を、その改画に組織因子を発現する腫瘍相応を有する被検者に投与することができる。このような腫瘍相応の代表例は、胸及び肺のがAB物である。

ここで考案された抗腫瘍は軍の代表例にはいい、「、\*\*\*Re、\*\*\*Bi 及びこれに領するもののような放射性核構がある。放射性核構結合モノクローナル抗体治療組成物の製造住及びその使用法は、コ ザック(Kozek)等(トレンズ・イン・バイオテクノロジー (frends in Biotech.) 4巻、259~264頁(1985年)) により組合されている。 平成 7.12.20 発行

により開始する森集を中和する抗体分子を生産する。さらに、 トuTPh:因子はノロ。の複合体と免疫反応するハイブリドー マ生歴抗体は、核抗体の、トuTPhポリペプデドpl-30又 はp26-49、好なしくはその両方と免疫反応し、かつ、より 好なしくは、核抗体分子が、ポリトuTPhポリペプデドp56 -71とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

型 に しい 免疫 特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質をして、またはポリペプチドと免疫反応する 放体分子を生産する (分泌する) ハイブリドーマの作成法は、当分野ではよく知られている。 特に、ニマン (Himam) 等により報告されたハイブリドーマ技術は (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Pvoc. Nat)。 Acsd. Sci.) USA、80巻、4949~4959頁 (1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、併130第5度に示した。

ハイブリドーマ培養物下F8-5 G 9、 T F 9 - 6 B 4 及び T P 9 - 1 0 H 1 0 はブタペスト協定に従がい、1 9 8 7 年 3 月 2 7日ATCCに保管され、各々受理委号、H B 9 3 8 2、 H B 9 3 8 1 及び H B 9 3 8 3 が割当てられた。

### K. 治療力法及び超成物

本発明のトロTFト因子W/WIIの結合部位ポリペプチド類位物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝無MaAbは各々、生体内において、組織因子による因子W/WIの結合を調賞するのに用いることができる。

例えば、huTFB因子U/VIBの結合部位ポリペプチド類似物は、効果量を被検者に投与したとき、因子VI/VIBの組織因子への結合を触令的に限容することができる、医療的に許容しうる組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子一因子VI/

投与されたポリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又はサスペンジョンの形をしているが、ポリペプチドは、錠料、丸剤、カプセル、放出持続製剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、この組成物は、0.10%~95%、好立しくは、25%~70%の活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は坑体分子を含む治療組成物の調製は、この分野ではよく知られている。 典型的には、このような組成物は、 後体溶液又はサスペンジョンのようなほ射可能な形に調製されるが、 住射刷の液体溶液又はサスペンジョンを作るのに通している固体形としても 明製される。 またこの 調製物 はしば、 医療的に許容でき、かつ、活性成分に 適合する 試形剤 と 減合する の 例 大 ば、 典型的 試形剤としては、 水、 食塩水、 デキストロース、 グリセロール、 エタノール又はそれらに 類するもの及びこれらの組合せたものがある。 加えて、もし、 望安しいなら、 この組成分は、 加温利又はエマルジョン 化 列。 p F 段 街 研 の ような、 活性 成分の 効果を促進する 補助物質を少量含ませることも可能である。

平成 7.12.20 発行

ら妨碍される。

治療用のよりペプチド又は抗体分子含有組成物は例えば、単位 投与量の注射によるように、局所的に又は静脈注射により層便に 投与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる。単位投与。という疑 切は、ヒトに1回投与するのに適した、必要とされる希釈剤、す なわち、キャリヤー又はピヒクルと共に、望ましい治療効果をあ げるために計算された、予め決められた量の活性物質を含む、物 理的に分離されている単位を意味する。

該組成物は、役与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は処置される技体、低性成分を利用する技体の血根凝集システムの容量及び窒虫しい組織因子結合能の服害又は中和度に依存する。投与される必要のある活性成分の特定な重は、医鍼の体質に依存し、かつる各個人によっても異なる。しかし、適当なポリペプチド投与範囲は、1日に、急者当り、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、投与の経緯に依存する。第1回投与及び二次免疫の選正な治療計算もいろいろであるが、典型的には、一次投与後、1時間以上の関係をおいて、さらに注射又は他の方法による投与が繰り返えされる。別に、直流中、10ナノモル濃度から10マイクロモル濃度を維持するのに十分な、持続的診脈性人注も考案されている。し、公断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に十分な量の、分包は凝として、本発明の発現タンパク質ポリペプチド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。 また、この分包は減の使用段明書も含まれているのが普通である。 な思的に、"使用段明書・には、ば減速度には、混合するは深

イ上ノロジー (Scand. J. Janvaol.) 8巻、補版7巻、7~23 頁(1978年)、ロッドウェル (Bodvell ) 等の、パイオテク ノロジー (Biotach.) 、3巻、889~894頁(1934年) 及び米田特許第4,493,795号参照。

また、な断システムは、好ましくは分包の、特異的試策を含む。 "特異的結合試策"は、本発明の試策を選択的に結合できる分子 であるが、本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド又は抗体 分子ものものではない。代表的な特異的結合試策は、抗体分子、 補体タンパク質又はその断片、タンパク質人、血液凝集因子ほど 切っ、子ウシ組織因子及びそれに関するものがある。この特異的 結合試策は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと 結合することが望ましい。

好さしい態後において、特異的結合試測はラベル化される。しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試 宛を含むとき、典型的には、このは現は、増巾手段又は試取として用いられる。これらの監視において、このラベル化した特異的 結合試取は、この増巾手段が、反応複合有複合体に結合している とき、この増巾手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血清、血熱又は尿のような体液サンプル中の h u T F h の存在又は愛を検出するのに、イライザ、方式で用いることができる。 イライザ法 は、サンブル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素 - 抗族又は酵素 - 抗体結合物を用いた、酵素結合免疫吸着検定法のことである。イライザ法の扱明は、全て参考としてここに組込まれている、1982年、CA州ロサンゼェルスのラング・メディカル・パブリケーションから出版された、D. P. サイツ (Sites) 等の基本的及び臨床的免疫学、系く頃、

とサンプルの相対量、試取/サンプル混合物の雑貨時間、温度、パッファ条件及びそれに鎖するもののような、少なくとも1回の 検定法のパラメーターを明確に記述してゐる。

好ましい監視において、さらに、本発明の参照システムは、試 現を含む複合体の形成を知らせるラベル又は投示手段を含んでい る。

ここで用いられているように、様々の文法型の"ラベル"及び"指示手段"は、複合体の存在を示す後出可能な信号を度み出すのに直接又は間接的に関連する単一の原子及び分子を意味する。"生体内"ラベル又は指示手段とは、被後着の体内で有用なものである。どのラベル又は指示手段も、本発明の技体又はモノクローナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、又はポリペプチドに結合又は起込まれていることもあるし、また別々に使用されることもあり、また、これらの原子又は分子でルは、弦圧的診断化学においては、よく知られているものであり、れらが、他の新しいタンパク質、方法、そして、又はシスとともに使用されるときに限り、本発明の一部を構成する。

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンベク質のラベル化は、3分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生産される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性関位元素含有アミノ酸の代謝的取込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ(Galire)等の、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Neth. Eazymol.) 73巻、3~46頁(1981年)) 参照。活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス(Apraness)等の、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第4,016,043号に報告されている。

このように、好去しい無機において、本免明の免頭したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この診断システム中に、分包されている固体サポートを形作っている。

典型的に、この試演の固体マトリックスの固定は、他の固定法 もあるが、この分野でよく知られている水性媒体からの吸者が用 いたれている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、ファルマンア・ファイン・ケミカルズ社 (NJ州、ビスカタウェイ)から、セファデックスという登録関係で応じされている、架橋デキストラン:アガロース:『し州、北シカゴ、アボット・ラボラトリーズ社から市底されている直径的 Iミクロン〜約5ミリメートルのポリスチレンとーズ;シートサイクのボリ 選化ビニルポリスチレン、架構ポリア リルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの積物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルできているチューブ、プレート又はマイクロブレートのウェルが含まれる。

ここで述べられている診断システムの状況、ラベル化結合試別 又は、増巾試別は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、 連結乾燥型のような、実質的に乾燥がとして提供される。指示手 段が酵素である場合、この酵素基質も、システムの別の包むに提 供される。先に述べた、マイクロブレートのような固体サポート 及び1つ以上のバッファも、この診断検定システム中に別にパッケージされた要素として含まれている。

診断システムに関連して、ここで協論されているパッケージは、

は断システムにおいて週常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラスチック繋の〈例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリカーポネート〉ポトル、パイアル、プラスチック及びプラスチックホイルでラミネートした外袋物及びこれらに似するものが含まれている。

### 1. 按定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている、免現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することにより h u T F h を検出する方法を考認した。当業者には、これらの複合体を形成するのに利用で含る多くの、よく知られている医床的は断の化学手段があることが理解できよう。使って、兵型的検定方法がここで以明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

### 1. 南路路出

被検者中に存在する血性検出法が考案された。生体内での指示手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル 抗体組成物を、被検者に診解性射する。好ましい臨機において、 ラベル化した抗体は、huTFh及び第1要及び第2要のポリペ プチドと免疫反応するがp204~226とは反応しないもので、 好ましくはハイブリドーマTF8-5C9、TF9-5B4又は TF9-10H10から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血栓の一部に存在する h u T P h と反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一掃されるのに十分な付加的時間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。 2.身体サンブル中の h u T P h の検出

## - トした。

その後、残留脳組織固体を各々、その固体をヘブタン: ブタノール (2:1) 25ミリリッドル (ms) 当り、組織関体1sの割で、ヘブタン: ブタノール (2:1) と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで建過により、その固体を回収する。最後の建造後、残留脳組織関係を再び大気圧下、約20で一晩で乾燥し、散財脳組織粉末を作り、必要になるまで、-80でに保存する。

つづいて、脳組織粉末 2 5 グラムをTS/EDTAバッファ(100 & リモル濃度(n M) NaC & 、50 n M トリス・塩酸(セ7.5)、0.0 2 % アジ化ナトリウム、5 n M エチレンジアミン四 計酸(EDTA)、0.1 %(V/V)トリトン×-100(ポリアリルエチレン-9-オクチルフェニルエーテル))500 n & と混合し、ついで 4 でで一般 機体する。さらにこの混合物を15.300×8で1時間遠心する。生じたベレットを500 n & のバッファ A(100 n M M a C & 、50 n M トリス・塩飲(p87.5)、0.02 % アジ化ナトリウム、2 % トリトン×-100)に再以濁し、スラリーを作る。定温で1時間の機律後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上波を回収し、凍結乾燥した後、100 n & のパッファ A に溶かして、h u T F h 合有福抽出溶液を作る。

## 2. h u T P の凝血活性を測定するための凝集検定法

huTPプロコアグラント活性を、37℃に維持した、全は限及び混合物を用いて行う、1段階級無検定法で測定した。血強と同容積の、20mMクエン設ナトリウム2水和物及び140mM NaC & (pH7.4) を含む溶液を混合することにより、正常なヒト血法をクエン酸化した。TBS/BSA溶液(150mMyaC & 、 身件サンブル、好なしくは体液サンブル中のカロTPhの存在、及び好なしくはその量を検出するため、融合的又は非残合的な、建々の不均一及び物一校定法が利用できる。別えば、液体体液サンブルと、ラベル化したp26-49を、マイクロブレートのウェルの内壁に固定した、ハイブリドーマTP8-5G9又はTF3-10H10から生産された抗体分子を含む固体サポートと混合し、固核相免疫反応混合物を作る。この混合物をサンブル中に存在する加工TFh及びラベル化したp26-49が、固体サポートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固相免疫反応度物を形成するのに十分な時間、生物学的検定条件下に維持する。未結合のラベル化p26-49を、免疫反応度物から取り強く。その後、免疫反応度物として結合したラベル化p26-49の量を測定し、その差により、huTPhの存在を検定できる。例

次に示す例は、本発明の説明を意図したもので、これを制限するものではない。

## 1.組織因子含有ヒト脳抽出物の開製

生技で得られた正常なヒトの脳を12時間以内に処理するかもしくは、-80でに保存する。その強旗及び大脳を除き、ついで残存する脳部分を、ボリトロンホモジナイザー (NY、ウェストバリー、ブリンクマン、インスンラメント社)を用いて、移容量の冷(0で)アセトン中でホモジネートした。このホモジネートしたものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その組織固体で分を、焼結ガラスロートを用いて確遇して回収した。各々7回の2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづく確遇により、残害するアセトンで、20で、一晩、残智固体から大気圧下でエバポレ

50mMトリス・HC & (pR7.5)、0.1%子ウシ血清アルブミン)で発釈したhuTFを合むサンプル100マイクロリットルを、100 p & のクエン酸化血器と混合した。25mMCaC & 。溶液100 p & を混合し、凝集反応混合物を作り、凝集が指定るまでゆっくりと描らした。CaC & 。 浴加と、凝血形成の間の時間を測定した。それから、huTP活性の標準曲級を、抄で示した凝集時間と発釈率をプロットすることにより作った。代表的複準曲線を第3回に示した。

## 3. huTFの観和性単贈のための、因子な合有固体サポートの

ヒトの因子はノWョを参考文献として組込まれている、フェア( Pair )の報告 (ブラッド (Blood)、6 2 巻、7 8 4 ~ 9 1 頁 (1 9 8 3 年)) に従って単類した。この単層した因子リノWョを、アガロース固体マトリックスに結合するため、4 でで一晩、その5 ミリグラム (mg) を、0.1 M 2 - (N-モルホリノ) エクンスルホン酸 (MES) (pH6.5) に対して透析した。塩化カルシウムを最終速度1 mMとなるように添加した。それから因子リノWI a を 4 m 2 の 7 ファゲルー 1 5 簡性化アガロースピーズ (C A 州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社) と混合し、生じた結合反応混合物を、製造業者が推薦するもの (バイオラド) に従って4 て、4 時間の回転処理を行った。

図体サポート上の過剰タンパク質結合部位を、その固体サポートを、0.1 Mグリシンエチルエステル中、 選温で 1 時間規律することにより、ブロックした。その後、この固体サポートを、焼詰ガラスロート上各約20 a M NaC 4 含 有バッファ A、図 5 a M BDT A含有パッファ A及び(4) 1 a M C a C 4 a 含 おパッファ A をこの環序で用いて洗浄した。それか

ら遇到の液体を波圧下で缺き、半乾温状の粒子物質(ケーキ)を 作った。

4.huTFの因子VI/VI=競和性による単語

0.1 Mのグリンンスチルエステル及び 0.1 M MES(pH 6.5)を含む 2.0 m & の溶液を、 2.2 5 m & のアフィゲルー 1.5 アガロースピーズ (パイオラド) と混合し、結合反応混合物を作る。この結合反応混合物を重温に1時間維持する。この生成した結合物を、焼結ガラスロート上、1.0 倍容のパッファ l を用い、液圧下で透過することにより焼きし、グリンンエチルエステルーアガロースケーキを作る。

例1で開製した30mをの脳治出溶液を、1mM塩化カルシウムを含む6リットルのパッファAに対し、4で、1 軌透折を行う。透析した脳治比物を、グリシンエチルエステルー丁ガロースケーキと混合し、固被相反応混合物を作る。回転しながら重温で2時間維持した後、この固液相を焼結ガラスロートを用いて被過することで分離する。この液相を回収し、最終濃減mを当り10ユニットとなるようにトラシロール(MO州、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチニン)と混合する。この回収した液相を例3で開製した因子ロノ収m/アガロースケーキと混合し、第2の固ノ液相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一晩もでに維持し、AuTP-因子は「但a合有固相度物を形成させる。その後、この固相及び液相を洗に述べたように維通により分離する。焼結ガラスロート上に残留物する固相を1eM塩化カルシウムを合むパッフェA25aAで洗浄した。さらに、この固相を焼結ガラスクロマトグラフィーカラム (0.5×15cm、パイオラド) に珍し、6m4の同流浄パッフェで洗浄した。上記の洗浄後、この固体サポートに結合

huTFを、10分の1容のTF8-5G9又はPAb100
(ATCC-TIB115;ここで本ガティブコントロールとして用いられているSV40ラージT拡原特異的抜体を生産するハイブリドーマ)ハイブリドーマ培養上清とともに、4でで1塊インキュペートすることにより免疫比較化を行った。アガロースピーズ(MO州、セントルイス、シグマ・ケミカル社)上に固定したヤギの抗マウス1gCを、その 類1次免疫反応度物を吸収するのに用いた。このビーズを開バッファでよく洗浄し、結合した\*\*\*!ートロTPを、DTT存在下又は非存在下、同バッファ中で5分間煮沸することにより溶出した。SDS-PAGE後、タンパク質パンドはオートフルオログラフィーで可視化した。

単離したAuTFを放射性ヨウ素化し、DTTで還元し、ついで10%アクリルアミドゲルでSDS-PAGE分析したとき、47kダルトンの見かけの分子量をもつ単一のメインパンドが観察された(第4図)。しかし、未運元のAuTFを同様に分析した場合は、およそ58及び47kDaの2つのパンドが相対的に等しい量で観察され(第5図レーンB)、このことは、少なくとも2つの異なる多ささのものの存在を示している。

非違元で観察されるこの2つのベンドに対する説明としては、その大きな方、すなわち、泳動が違いベンドは、非常に多くのグリコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けていないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィド結合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないというものである。遠元後の単一ベンドの存在は、はじめの2つの示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいように思えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチド頃は、色素の場所又はその付近に泳動するような十分小さいも

平成 7.12.20 発行したAutre、 焼精ガラスカラム上に保持されている国体サポートを5mMのBDTAを含むパッファAで洗浄することにより、 設職 (溶出) させる。 溶出した物質を1m2 両分づつ回収し、各面分について、例2で述べた方法により、 hutro の存否を検定した。 Autre 合有面分を集め、 4でで、1%トリトンメー100を含む 5 リットルのTBS (150mM No Ca、150mM トリ

このようにして作った透析物をつづいて、4倍容の冷アセトンと混合し、huTPタンパク質を比較した。この比較をおよそー10で、5000×8、30分間の違心で無めた。生成したペレットを宣常雰囲気下で乾燥した。実型的な収量は、脱脂した疑題後粉末1ダラム(乾燥重量)当り、2月8のhuTPであった。

ス塩酸、 187.5) に対して1軌透折した。

このようにして生じた単離トロTFサンプルをTBS/F9トン中に無薄し、ついで、製造業者の指示に従がい(IL、ロックフォード、ピアス・ケミカル社)、ヨードゲンを用い、Na \*\*\*! でラベル化した(IL州、アーリントンハイウ、アマーシャム社、マイクログラム当り15マイクロキューリ)。ラベル化後、過剰の未反応\*\*\*!をTBS/Fリトンを用いたセファデックスG25(NJ、ピスカタウィイ、ファルマシア社)での設集クロマトグラフィーにより、ラベル化したトロTFから分配した。

のらしく、還元後、10%アクリルアミドでは分離されないので あろう。15%のボリアクリルアミドゲルの遺元及び非違元bull の電気泳動は、単一の分離した軽値を示すのには失敗したが、い くつかの少量の、速く泳動するパンドが観察された(第5回、レ ーンA及びB)。これらの小さい、少量のポリペプチドは、以前 に報告されているように(ブローズ (Brose))等、ジャーナル・ オブ・パイオロジカル・ケミストリー( J. Biol. Chem.) 、260 #:10917~20百(1985年) 及びゲハ (Goba) 夢、プ ロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエ ンス (Proc. Batl. Acad. Sci.) USA、83巻、299~302 夏(1986年))、汚塾物を示している。この可能性を明らか にするため、41kDa 及び58kDa のパンドは非運元ゲルか ら切り出され、その各々を、ジチオスレイトールで運元し、その 各々も、15%アクリルアモドゲルを用いたSDS-PAGPに かけた(第5詞、レーンC及びD)。581Dタンパク賞は125 kD軽値及び4.7kDa 重値であると分った。4.7kDa のタンパ クサを分析したとき、紹介子書の重視のみが観察された。このよ うに、両者は、SDS-PAGEで同様の学動をもつ重額を保育 していた。

直接軽額の存在を示すため、1211 - h u T F を、h u T F 特 其的モノクローナル抗体 T F 8 − 5 C 9 で免疫沈酸化し、それを 運元刑存在下の電気泳動にかけた。主要な 4 7 k D a パンドがお よそ、 Y 2.5 k D a の分離したパンドとともに関奪された(第 6 図、レーン A)、 運元化しないサンブルの電気泳動でおよそ 4 7 k D a 及び 5 8 k D a のパンドを生じたが、低い分子量のポリペプ チドは生じなかった(第 6 図、レーン B)。 また非運元 b u T F の電気泳動は、ブローズ(8roze)等(ジャーナル・オブ・パイオ ロジカル・ケミストリー(J. Bipl. Chem.)、260巻:10917~20頁(1985年))により示唆されているhuTP登録のダイマーと一致する、少量の90kDa タンパク質も示した。.

huTF軽額が重額からタンパク質の分解によって生ずるという可能性を研究するため、SDS-PAOEにより早難した軽額及び重額を、N末端アミノ登配列分析にかけた。

重須及び軽額をSDS-PAGEで分類し、アパーソールド (Abersold)等の高pH法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chea.)、261地、4225~4238 貝(1986年))を用い、活性化した、アミノ被覆ファイパーガラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質パンドモ、蛍光染料(アパーソールド(Abersold)等、上記)により、このブロットを可視化し、切り出し、そして、まだファイパーガラスに結合した言定、PTH誘導体のオン・ラインHPLC分析を、用いたアプライド・パイオシステムズイ10Aタンパク質シークエンサーで配列決定した。別にタンパク質パンドをコマージ・ブルーによる染色によりゲルを可視化し、シークエンシングのために、電気宿出した。阿方法とも等しい結果を与えた。

トロTF重質のマイクロシークエンシングは、ほぼ等モル量のフミノ政区列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ政及番は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さがN末端で2残器異なるトロTF重額の2つのバリアントがねじれたN末端をもつことの明白な延迟である。大きい方のバリアントのN末端は、非特定のアミノ及Xを合む

Ser-Gly-X-X-Aso-Thr-Val-Ala-Ala-Tyr-X-Leu-Ibr-Trp-Lys-ser であることが誘導された。

軽値の配列決定するいくつかの試みは、ブロックされたN末端。

タンパク質染色によって、会合した小ポリペプチド旗を検出する にとは困難である。

N結合オリゴ糖の役割は、\*\*\*1-huTFサンブルの酸グルコシル化により試験した。 毎分およそ 3.6 × 1.0 \* カウントを含む、ラベル化トuTF 約1.2.7 4ナノグラムを 0.4ユニットのグリコペプチダーゼ F (IN州、インディアナポリス、ベーリンガー、マンハイム・バイオケ 3.カルス社)、2.0 mM トリス塩酸(pH7.5)、1.0 mM BDTA、及び1%トリトンX-1.00を含む 2.0 μ g の溶液と混合し、3.7 でに1.6 時間維持した。それから、この酸グリコシル化した度物を、先に述べた SDS-PAGE で分析した。

第7図、レーン 4 及び 5 に示した、脱グリコシル化の研究結果 は、5 8 k D a の h u T P は、別のタンパク質部分、すなわち軽 鎖の存在のため、4 7 k D a のものよりも、高い相対分子量を示 すことを表わしている。

・このようにして母難した h u T P を、再脂質化し、そのプロコアグラント活性が再構成された。 級高の活性を有する再脂質化組

平成 7.12.20 兹

と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、bolfの重複及び軽複は、単層されたhuTFに対して生じた、2つのウサギの抗huTP抗血構及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全てが、重複のみに結合することが分っていることから、抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽複は、重複のタンパク質分解断片とは考えにくい。さらに軽値は、ベーター。 ミクログロブリンに対する抗血液とは反応しなかった。

現在、125kDのhuTF軽額の意味は知られていない。それは、単一の、独立した分子様なので、ランダムなジスルフィド交換による、単層の際にアーティファクトとして誘導されたものでもないようだ。 選元なしに、観和性による単層を行ったbuTFをSDSーPAGEにかけたとき、huTF活性は、58kDaと47kD。の分子費に対応するゲルから得出した。これら2つの分子費に対応するhuTF活性も、担脳又は部分的に単層した胎盤の抽出物を、SDSゲルの建筑次数にかけたとき(データ示さず)も検出された。全ての場合において、その活性は、因子収依存で、このことは、huTP特異的活性を示している。これらの知見は、huTPのみが因子収を活性化でき、かつ、軽額はこの機能に必要ないことを示している。

軽額がトuTF重額のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは異味深い。生体内で、トuTFの建要な領域に不在なのか、存在するのかとは別に、界面活性列で分解される、非共有的相互作用を介して会合しているのであろう。軽額は、サイズが小さく、SDS-PACEの際にマーカー色素の部分に泳動してしまうため、また、トuTPの報告されている分析例が遅元後行なわれていることから、初期の研究では気づかれなかった。現行の現和性を用いた方法で早額することができる制度された量では、

成因子庭物を提供するのに必要な組織因子:脂質比が、0.1 %BS Aを含むHBSパッファ溶液(20mMへペス、pH6.0、140mM NaC A、0.0 1 % アジ化ナトリウム)中、種々の濃度となるように、上述の得られた単離 huTFを溶かすことにより実験的に測定された。それから、種々 huTF 粉釈物を以下に述べるように再脂質化し、さらに、例2 下程告されている凝集検定注で測定された、最も高い活性を示す止が、後の使用のために 場面された。

トロTFの再開質化のための脂質は、MO州、セントルイス、シグマケミカル社から入手できるウサギの脳フセトン抽出粉末から抽出することにより関製した。この粉末を、粉末18に対し、25mをのヘブタン:ブタノール(2:1、v/v)の割でヘブタン:ブタノールと消合し、ついでこれに含まれる固体を焼結ガラスロートを用いた減過により回収した。残智固体をロト・エバポレーションで乾燥し、クロロホルムに溶解後、-89でに保存した。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した簡単を選集雰囲気下で乾燥し、新しく調製した0.25%のデオキシコール設ナトリウム溶液中、4mg/mgとなるように溶解し、ウサギ脳リン脂質熔板(PBPL)を作った。

再設置化には、各トロTF希釈物100μ 4 を、100μ 4 の RBPL海液、0.76 m 4 の1分 ウル 血オフルブミンを含む H BS溶液 (HBS/BSA) 及び 4 0 μ 4 の100 m 地 化カド・ミウムと混合する。この混合物を 2 時間、3 7 でに 推持し、ついで、ここに含まれる h u T F 活性を、例 2 で述べた 乗乗検定法で 知定した。

5. ハイブリドーマ及びモノグローナル抗体の作成

全てのハイブリドーマは、6~8週間の年令の、スクリプス・ クリニック・アンド・リーサーチ・インスチチュート、動物飼育 場から入手できるメスのBelb/cマウス由来の興味細胞を用いて作 成された。

## a. マウスTF8の免疫化

例4で周辺した観和性単層化AuTF5マイクログラムを100 μg/egとなるよう生理食塩水に溶かし、MO州ハミルトンの リビ・イム/ケム・リサーチ社から入手したR-700アジュパ ントと1:1の割合で混ぜ:エマルジョン化した。ついで、この エマルジョンをマウスTFBに皮下注射した。

このマウスTP8は同様に、約2週間後、変性huTP及びR
- 700アジュパントを含むエマルジョンの換種を受けた。変性
huTFは、0.09%トリトンX-100、0.93%SDS、
0.2 M-2-メルカプトエタノール及び270gg/mg hu T H を含むTBS(150mM CaC gg 、50mMトリスーHC g (pH7.5)を、5分間煮沸して調製した。その後、この変性したhu T P を、等容量の、0.6 mg/mg マウス血清アルプミンを含む生理食塩水と混合した。つづいて、4倍容のフセトンを、この変性 hu T F 溶液に混ぜ、生じた混合物を、一晩、-20 でに保った。生じたけ酸を約13000×g、10分間の遠心で無め、4:1(マ/マ)のアセトン:水で一度洗浄してから、0.1 mg/mg の場質となるよう、200 μg の生理食塩水で懸濁した。

最初の注射から、約4週間後、0.1m2 生理食塩水中33μ8: の親和性単離化 h u T F を、0.1m2 の完全フロイント・アジュ パント (c F A) と混合し、エマルジョンを作り、これをマウス T F 8 に腹腔内注射をした。

最初の接種から8週間後、リン設護街食塩水中15μgの観和

ユ・パイオケミカルズ)をイムロン・96次フレキシブル・ビニルマイクロブレートのウェルに入れた。それからこのブレートを、1時間、37℃を譲待し、1gGをウェルの壁に吸着させた。
TBSで3回洗浄した後、3メオバルミンを含む100gLの
TBS/トリトンを各ウェルに入れい過剰のタンパク質結合部位
をブロックした。

ウェルを、1 時間、約20℃に維持したのち、そのブロッキング溶液を、アスピレータで除いた。そして、各ウェルに50μεのハイブリドーマ培養上清を加えた。できた固領相免疫反応混合物を1時間、37℃に維持した。その後ウェルをTBSで3回洗冷し、過剰の彼は、アスピレータで除いた。

例4で調製した、TBS/トリトン中、およそ10gのhuTFと、およそ5×10°cpmを含む、50pgの1391ラベル化huTFを各ウェルに入れ、第2の固被相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した「331」ーhuTF含有免疫反応運物を単離した。過剰の液体はアスピレータで除き、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り即し、各ウェルに含まれる1331を、ガンマカウンクで計数した。

パックグランド放射活性 (ハロTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当り、平均約200~300cpmであったが、一方、ハロTFと抗体の反応が有る場合は、ウェル当り10000cpmのカウントがある。抗カロTF抗体の生産が正と検定されたハイブリドーマを選択し、本発明のハイブリドーマとした。つづいて、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・ブロット検定でスクリーニングした。

## b. ドット・ブロット・イライザ法

倒すで調製した、アセトン沈設したhuTFを、4:1 (v/v)

## 平成 7.12.20 発行

性単類化トロTFを静脈注射(1. v.)し、同じトロTF/PBS接種を24時間後にも行った。そのマウスTF8の腕和数を融合のため3日後に採取した。

## b. マクスTF9の免疫化

マウスTP9は、2回のリビ・アジュペント注射に、エマルジョン化前に変性した b u TPを用いること以外は、マウスTF8と同じ接種スケジュールがほどこされた。さらに、第1回目のPBS接種の整数内注射をCFA会有接種後 4 ケ月半後に行なった。

## c. ハイブリドーマの作成

TP8及びTP9由来の脚綱助に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の脚細胞約1×10°個を、30%ポリエチレングルコール(PEG4000、ATCC25322-68-3)を含む200月2の融合媒体中、2×10°のP3X63Ag8.653.1ミエローマ細胞と混合した。細胞融合後、生じたハイブリドーマを96次プレートに被補し、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン)中で培養し、つづいて、AuTPと反応する抗体分子生産総でスクリーニングした。

四マウスTF8及びTF9脚和陸由来の融合体共、HAT融合 媒体耐性ハイブリドーマ細胞クローンを生じた。TPB融合体は 907個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF9融合体は、 348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

6. 抗huTF抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリー ニング

## a. 固相RIA

TBS中、20με/mをに希釈した100μεのヤギ抗マウスIeG (IN州、インデアナポリス、ペーリンガー・マンハイ

のアセトン:水溶液で抽出した。残存する沈設をTBS中に20 PBブ=8となるように整備した。このhuTP溶液20ps (1ps)を、清えないインクで、BA83ニトロセルロース紙 (シュレイチャー・アンド・シュエル、NH州、キーン)上に書いた数字の隣にスポットする。スポットしたhuTPを空気乾燥し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個々のディスクを、BLOTTO(ジョンソン(Johason)等、ジェネッティック・アナリティカル・テクニック(Gene、Anal. Tech.) 1巻、3頁(1984年))を含む、多穴トレイの個々のウェルに扱し、約1時間、37℃に維持した。

この日LOTTOを、ウェルからアスピレータで飲き、各ウェルに、200月8のハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37℃に保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトプロット試策キットの(MI州、アン・アーパー、プロメガバイオテク社)アルカリホスファターを結合抗マウス leCを、BLOTTOで 5 1 0 0 倍に希収し、このペーパーディスクと佼験させた。このプロトプロット溶液との接触を、 8 1 でで 3 0 分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3 回洗浄した。楽者の指示に従い、プロトプロットキット中に含まれている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファクーゼが検出される。

## c . ウェスタン・ブロット検定法

ウェスタン・ブロット検定のため、例4で報告したように卓離 した約10zgのhuTFモサンプルベッファ(2%SDS、

5 0aMジチオスレイトール、10%グリセリン)に溶かし、5 . 分間、盆沸した。それから、これを、レムリ (Leonn)i)により報 告された (ネイチャー (Mature) 、 2 2 6 巻、 6 B 0 頁 (1970 年))、参考としてここに組込まれている、予め染色された分子 **豊根準の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードす** る、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲ ル電気泳動にかけた(分子量振珠:MA州、ニュートンセンター、・ ディパーシファアイド・パイオテク社)。 参考としてここに組込 まれている、小ウピン(Tombia)箏(プロシーディング・イン・ナ ショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Rati. Acad. Sic.) USA, 7 6 老、 4.9 5 0 頁(1 9 7 9))により報告されて いるように、質気液動及びニトロセルロースへの質気ブロッティ ング後、このプロットを、TBS中の5%脱脂粉乳溶液でプロッ クし、マニホルドに固定した(M人州、ケンブリッジ、イムネチ クス社、ミニブロッタ)。 B 個のハイブリドーマ和胞培養上情の ストックを、各マニホルドスロットにロードし、31℃で1時間: インキュペートした後、このブロットを取り除き、TBSで焼浄 した (0.02%アジ化ナトリウム合有TBS)。 抗体が結合した レーンを、発色物質で発色させたアルカリホスファターゼを結合 した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可提化した (Wi州、マジソン、プロメガバオテク、プロトブロット)。降 性のストック由来の培養上清を、5%脱脂粉乳TBSによる8倍 着釈物について、別個に再テストし、抗丁ド抗体を生産する個々 のハイブリドーマクローンの何定を行った。

抗トロTF抗体度生が正と判断されたハイブリドーマをさらに 特徴づけるために選択した。例えば、上記のTF 8 融合体由来の ハイブリドーマは、例 6 Dで述べられているドット・ブロット後

5 G 9 モノクローナル抗体 1 0 mg の透析により、活性化した。浩性化したTP 8 - 5 G 9 を、 2 m 1 の T フィゲルー 1 0 T ガロースピーズ (パイオ う F) と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に促がい処理して、T F 8 - 5 G 9 / T ガロース固体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をプロックし、洗浄後、波圧濾過して、TP8-5C9/アガロースケーキを作った。

## 9. huTFの免疫気和性による単脂

ヒトの輝のおよそ学分、すなわち約100alに等しい、例1で調製した顧詢出海液を、計61のパッファAに対し、2回の外液交換をしつつ、4でで3日間透析した。その透析した抽出物を1.5時間、10,000×8で違心した。できた上清を、例4で調製したグリンンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間窒温に維持したのち、その個相と液相を塊結がラスロートによる護過で分離した。そのhuTF含有液相を回収し、例8で調製したTF8-5C9/アガロースケーキと混合し、図/液相免疫反応混合物を作った。

上述の洗浄後、その固体サポートに免疫学的に結合している huTF、その固体サポートを、焼詰ガラスロート上に保持した 足住及び例6 c で述べられているウェスタンプロット検定法で h u T P との免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上情が示すならば、抗boTF K 体 座生ハイブリドーマ培養と特徴づけられる。これらの特徴は、2 4 個のT P 8 ハイブリドーマ協教を強力について みられ、そのはとんどは、例13の第5 支に示した。その他のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより産生される抗体 分子は(1)解剖版を独自の融合体に提供する免疫化マウス (すなわちT P 8 又はT F 9)、及び、独特の月人 T 地球耐性ハイブリドーマ細胞が単離される、9 6 六物製プレート、列番号及びウェル 書号を示す文字によって呼ばれる (すなわち、5 8 7、1 1 D 1 2、その他)。特殊な意味の文字は、1 5、ハイフン語又は 2 ほとして、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している;T P 8 - 5 C 9 及びT P 8 - 5 C 9 と T P 8 - 5 C 9 及びT P 8 - 5 C 9 な T P 8 - 5 C 9 及びT P 8 - 5 C 9 な T P 8 - 5 C 9 な T P 8 - 5 C 9 な T P 8 - 5 C 9 な T P 8 - 5 C 9 及びT P 8 - 5 C 9 な T P 8

## 7. イムノグロブリン 1 a C の単辯

イムノグロブリン」。Cは、製造業者の指示に使がい、パイオラドラボラトリーズMAPSTシステムを用い、マウスのハイブリドーマ相助系列TP8-5C9 (ATCC原HB9382号)を含むマウスの買水液から単離される。単離した1gCのタンパク質流度は、製造業者の説明書に従がい、BCAタンパク質技定は類(ピアスケミカル社)を用いて測定した。

8. huTPの免疫観和性による早難のための、抗huTP含有 固体サポートの問題

抗トロTP抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも1回透析液交換を行う、0.1 M MES、pH6.5を含む500mkの透析パッファに対する、4で、16時間の、例7で報告したように顕製した、MAPS単離TP8ー

まま、0.1 Mグリシン、 pH 2.5 及び 1 分トリトンX - 1 0 0 溶 波 2 0 m 4 で洗浄することにより、開放 (溶出) した。それから、例 4 に全て述べたように、溶出物質を回収し、 h u T F 検定を行ない、集めて透析した。

透析物を ( 倍容の冷アセトンと混合し、 h u T F タンパク質を 比較化した。さらにこの比較をおよそ - 1 0 ℃、5,000 × g 、 3 0 分の遠心で築めた。生成したペレットをפ素雰囲気下で乾燥 し、そのペレットの一部を変性条件での S D S ー ポリアクリルア ミドゲル電気氷動で分析した ( S D S - P A G E ) 。

第8図に示したこの分析結果は、huTFが免疫現和性により、 脱脂間切束1グラム当り、33 mgのhuTFの収率で単離される ことを示している。

## 10. 抗トロTP抗体による凝集の阻害

10μ 4のハイブリドーマ均癸上清を、例4で調製した約2ng の再脂質化 h u T F を含む 90μ 4のHBS/BSAと混合した。 このようにして作った免疫反応混合物を30分間31でに保ち、 抗 h u T F 抗体分子を免疫学的に h u T F に結合させ、免疫反応 産物を形成させた。つづいて、この免疫反応混合物について、例 2で述べたように、 h u T F のプロコアグラント活性を検定した。 ネガティブ・コントロールとして、無関係の1g C 調製物を抗 h u T F 抗体の代りに用いた。

効果的 h u T F 温度は、インヒビターの存在下測定した 凝血時間を用い、例 2 のように作った領地曲線から外持した。限客は、用いた実際の h u T F 温度の比率として表わされる。少なくとも 5 0 パーセントの阻害をするモノクローナル抗体分子腐勢物は、本発明の抗体分子成分を中和するものとして選択された。

例 6 に述べたように、 早難した h u T F に対して生じたハイブ リドーマ由来の数多い培養上すを、 磁集開始を限省する能力につ いて、先の操作により測定した。 有意に凝集を阻害することが分 ったハイブリドーマを、第 5 表に示した。

変た、抗トロ丁下抗体による磁無阻害は、予め形成されたhutp-因子以複合体を用いて行った。例4で調製した再設質化した トロ丁F 1 ngを含む 1 0 pg 2 を、日BS / BS A 7 0 pg 4、2 0 mm 4位 カルシウム 1 0 pg 2 を、日BS / BS A 7 0 pg 4、2 0 mm 4位 カルシウム 1 0 pg 2 と複合する。この混合物を 1 5 分間 3 7 でに保ち、 hu T P を、 混合物として 使 える因子 で と複合体をつくらせる。その後、 1 0 pg 4 の溶液に、 例7 で 述べたように 調製した MAPS - 単単化モノクローナル 流体的 1 0 ng を混合し、この第 2 の 流合物を、 3 0 分間 3 7 でに保った。 さらに、 第 1 に 2 0 nm 塩化カルシウム 1 0 0 pg 4 ついで、ヒトのクエン酸化血無又は例1 2 で述べてように 調製した因子 14 欠損血無を加え、ついでかで表わされた凝血時間を 10 mg 2 で 2 により、生成した 12 で 3 で 3 で 3 で 3 で 4 で 5 を 4 で 6 を 4 で 6 を 4 で 6 を 4 で 6 を 4 で 6 を 4 で 6 を 7 で 4 を 7 を 7 を 8 を 8 を 2 に 示した。

第 6 表

抗huTFによるhuTF-因子以佐存の最集阻害

1. クエン酸化ヒト血漿による凝集 。

统 体	因子说。	阻害率
プランク <b>・</b>	+ .	. 0
TT8569*	+	5 8 %
コントロール・	+	. 0
TF85G9	<u>.</u>	8 3. 🔀

複合体によう開始する凝集を阻害する能力を有意にもつと考えた。 これらのM o A b には、TF 9 - 1 B 8、TF 9 - 5 B 7、TF 8 - 5 C 4、TF 8 - 1 1 D 1 2、及びTP 8 - 2 1 F 2 がある。 1 1、ポリペプチド合成

ここで使用されている様々のhuTPh領域に対応するまりペプチドモハゲンメイヤー(Ragensaier)等(ポップーセイラーズ(Boppa-Seyler's) 2. フィジオロジカル・ケミストリー、353 巻、1973頁(1982年))のシンメトリカル・アンハイドライド法を用いたアプライド・バイオシステムズモデルも30人ペプチド合成級で化学合成した。第1及び第2表のポリペプチドに加え、以下に示す第3表のポリペプチドも合成し、これには、huTPhと反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本発明のポリペプチドが含まれている。

## 第 3 表抗原性ポリペプチド

p121-155 H-TKYNTYIDIRTLYRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTL-ON
p204-226 H-DSPVECMGQIKGEFREIFYIIGA-ON

p225-244 H-GAVVIVVIILVIILAISLHX-OH p245-263 H-CRKAGVGGSWKZNSPLNVS-OH

## 12、ポリペプチドによる凝集阻害

AuTF依存の職業開始を疎開する、本発明のポリペプチドの 能力を、まず、このポリペプチドを因子リンとの及びカルシウム イオン存在下でインキュペーションし、さらにこの混合物を、因 子リンはa欠損血強に加えて、凝血時間を見積った。

ヒトの因子切/VI a を列 3 に述べた方法で草葉した。HBS/ BSAag b り、この単葉した因子VI / VI 2 0 0 n g の終版 1 0 p g に、 i 0 0 μ g H B S、 2 0 μ g 2 5 mM CaC g 。及び100 B. 因子VIテプリート化ヒト血祭

コントロール

流 体	因子可	阻害平
ブランク	+	, 0
T P 8 5 G 9	. +	5 8 %
コントロール	+	0

- a. ・ブランク・とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなかったことを示している。
- TP85G3°とは、ハイブリドーマTF8-569から単語したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。
   コントロール°とは、検定で無関係なモノクローナル抗体を用いたことを示している。
- d. ・・・は、抗体を混合物に加える前、因子をを加え、情襲した h u T P と複合体を形成させることを示す。

抗huTF抗体による凝集図書の別の研究が、TFを図子をリノ はっと会合させ、TF:図子はノはっ複合体を形成させる前後の 図客を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTP:地グWaina在合体を用いた 飲わuTPh抗体による蓄無阻害を、利用するモノクローナル抗 体合有溶液10μ1にMAPS早離化モノクローナル抗体合有溶液の代りに、ハイブリドーマ培養上前を用いた以外、例10で述 べたのと基本的に同様に行った。比較のため、抗トロTP抗体に よる軽無阻害を、例10で述べたように、因子ほグMaを含むク エン酸化血強との混合の前、それら抗体及び再脂質化トロTPの 免疫複合体を形成することにより検定した。

ここで述べている全ての抗体は、この比較阻害検定試験を行ったが、約60%以上の阻害を示すものだけが、haTP:W/Wa

μ L の合成ポリペプチド含有TB S ノトリトンを加えた。種々の 遠皮で含まれる多種の混合物をこのように調製し、それを、15 分間、37℃に維持した。例くで述べたように調整した再脳質化 した組織因子を、HBS/8SAで希収し、例2で述べたような **森集技定法でテストしたとき、10μgでおよそ45秒の凝集時** 間が得られるように網製した。上記のように維持した混合物をさ らに、再賠賃化huTF10#2看収物、25mMCaC#s100 # A 及び 1 容の血器に対し 1. 5 容の H B S で希釈した因子で/Via 欠損血費 1 0 0 m g (KA州、オーパーランド・パーク、ジョー ジ・キング・パイオメティカル社)と混合した。凝血時間の歴長 は、この合成ポリペプチドによる凝集の阻害を示していることに なる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくと も30%の凝集阻害を示すポリペプチドはhuTFh結合部位ポ リペプチド類似物、すなわち;第4支のセクション!で示されて いるポリペプチド、p26-49、p146-107及びp161 - 1 8 9 である。

別に、上記阻害検定において、モノクローナル抗体による免疫 現和性吸者により、因子W/Wョ欠損血強である因子W/Wョ次 損血強を用いた。ヒトの因子W/Wョに対するモノクローナル抗 作を、例3で述べたように単輝した因子W/WョをトロTFの代 うに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様 に調製した。できたハイブリドーマを、イライザ法で評価し、 1 N州、サウスペンド、エンザイム・リサーチ・ラボラトリーズ 社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質S、因子IX、 因子X及び因子口と反応しないハイブリドーマを同定した。その ようなハイブリドーマ、FV11、F1、2H3-32は、「.5. エジントン(Edgington) 博士から戦いた(CA州、ラジョラ・

スクリプス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション 社)。イムノグロブリンIIGを、ハイブリドーマFV11、F 1、2月3-3.2を含むマウスの放水から単揺し、この単翹した 1gGを、例8に述べたように、固体サポートに結合させた。で **きた筑因子などなるモノクローナル抗体含有固体サポートを貯留。** した正常なクエン酸化血漿から、血漿含有粧相を収積し、保留す ること以外、例9で述べた免疫観和性操作を用いて、因子項/翌a を除くのに用いた。

胆質化型で用いたとき、蛙合的に凝集を阻害する、いくつかの ポリペプチドの能力を、100p1の合成ポリペプチド溶液の代 りに、100μ1の腹質化合成ポリペプチドを用いることにより 上記検定法での評価を行った。

脂質化合成ペプチドは、合成ポリペプチドを、単離したb a t P の代りに用いること以外は、単離したhuTFの再踏質化で用い た、例もで述べた方法で調製した。ルーチンには脂質とポリペプ チドの比は52:1(w/w)が用いられた、少なくとも30% の凝集阻害を起こす服費化ポリペプチドが、脳質化型で存在する とき、AuTP組合部位ポリペプチド類似物すなわち、第4表の セクションコで示されたポリペプチドと考えた。・

第 4 表

## カロTFhのボリペプテド頬似物の huTFによる凝集開始の狙害

	ペプチド	選 審	•
11	非リン脂質化ペプチド	•	썒 度
	p 1 - 3 0	2 5. 0	1 0 u M
	p 2 6 - 4 9	8 8. 8 .	10 u M
	p 4 1 - 7 1 ·	25.0 -	10 u M

- 5 0 μ 4 のハイブリドーマ溶美上清を各ウェルに入れ、1時間 37でに維持した。さらにこのウェルをTBSで3回洗浄し、過 刺の液体をアスピレータで除いた。

単離化huTPは、例9で述べたように、免疫規和性カラムで 凝裂した。単離化トロTFを含むアセトン沈段をTBS/トリト ンに溶かし、そのタンパク質濃度を、製造業者の説明書に従がい、 BCAタンパク質検定は双(ピアス)を用いて測定した。 buTF の炭化水素側填を、オシャネシー(O'shannessy) 等の報告した 方法(イムノロジカル・レターズ( lannuol, Letters )。 8 巻、 213~227頁(1984年))に従がい、ピオチンーヒドラ ジド(NY州、プレインピュー、ICNパイオメディカル社)を 用いて、ピオチン化し、ピオチン化huTP溶液を作った。

TBS/トリトン中60ng/maに調製した50μ4のビオ チン化huTF溶液を、5ヵM合皮ポリペプチドとともに、各ゥ ェルに入れ、1時間、37℃に維持した。その後、このウェルを TBSノトリトンで3回洗浄した。

5mM BDTA、0.5%トリトンX-1.00及び1%BSA を含むTBSで1/100に希釈した、100μgのストレプト アピジン-結合アルカリホスファターゼ(NY州、ニューヨーク、 エンゾパイオケム社、デテクIーalk)を各ウェルに入れ、30 分間、37℃に維持した。その後、このウェルを、10mMリン 設カリウム(p86.5)、2MBSA、0.5%トリトンX-100、 0.5 M塩化ナトリウム及び 1 mM EDTAを含む溶液を 4 回決い、 ついで検出パッファ (0.1Mトリス・塩炔 (pB 8.8) 、 0.1 M NaC & 、 5 mM NgC & 。 )で1皮洗った。

その彼、後出パッファ中、2mMのpーニトロフェニルリン酸

	•	平成	7. 12. 20	発行
	P 4 0 - 4 9	2 5. 0	10 u M	
	p 5 6 - 7 1	2 5. 0	10 u M	
	p72-104	2 5. 0	10 u M	
	p 9.4 - 1 2 3	2 0. 0	1 0 u M	
	p 1 2 1 - 1 5 5	10.0	10 u M	•
	P 1 4 6 - 1 6 7	8 Ť. 5	1 0 u M	
	p 1 6 1 - 1 8 9	3 2. 5	· 10 u M	•
	p 1 9 0 - 2 0 9	2 0. 0	10 u M	
٠	P 2 0 4 - 2 2 6	2 0. 0	10 v M	
	n L	0		
١.	リン胆質化ペプチ	F	•	
	P 1 - 3 0	8 1. 0	10 u M	
	p 2 6 - 4 0	8 3. 0	10 u M	
	p 4 0 - 7 i	6 5. 0	1 0·u M	•
	p 5 0 - 7 1	7 3.3	3 0 u M	
	p 9 4 - 1 2 3	9 3. 7	10 u M	
	p 1 2 1 - 1 5 5	5 5. 0	· 10 u M	
	P 1 4 6 - 1 6 7	8 0. 0	10 v M	
	p 1 6 1 - 1 8 9	9 4. 0	10 u M	
	•			

2. 別12で述べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド風害研究で得られた代表的投与一応各曲線 を第9及び第10回に示した。

13. ポリペプチドによる抗体-huTF免疫反応の阻害 フレキシブルビニルでできたイムロンU殴96介プレート(ダ ィナテク社)のウェルを遏制タンパク質結合部位のプロッキング を、37020分間行うこと以外、例6で述べた方法でヤギ抗マ ウス laG(ペーリンガーマンハイム社)によりコーティングし

を含む溶液100μgを各ウェルに加え、1時間37℃に維持す。 る。ついで、405ナノメーターでの先学忠度を各ウェルについ て、パイオ・テク・マイクロプレートリーダー(VT州、ウィノ ースキ、パイオ・テク・インスツルメント)を用いて測定した。 この鍵合的阻害研究の結果を第5項に示した。

## 第 5 衰

	군	ノク	<b>0</b> -	ナル	坑体	とベフ	' <del>+</del> F	の相互	作用	の安	
Nad*	ام 30-	p26 -49	P40 -71	p41 -49	. p56 -71	p72 -104	₽94 -123	p121 -155	p146 -167	p161 -189	p190 -209
TF85G9		+									
TF811D1	2	+									
TF85C4							+	•		•	
TF821F2					•						
TF9105					•		+		•		
TF92C4			1	•	+		•		•	•.	
<b>TF92F</b> 6						•				+	
TF95C7			4	,	•	•	+		+	٠.	
TF96B4					•				. +		
TP99C3			•		•				+		
7F910C2	•				+				+		
FP91F1		•									
TP91E7			•			+			+		•
F9188			ŧ						•	+	
F91B9		٠.	٠.								
F94D11		. +	ł		٠,						
P9564		+ .			•						
P95B7 .	٠,		•								
F96G4				٠			••				

TF99D5\* +

- a. 各モノクローナル技体(Mab)は、同名のハイブリドーマにより歴生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、ハイブリドーマ培養物上演を用いてスクリーニングした。
- b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた; その他の全ての抗体は、同結果に従がい中和性をもつと考えた。

もし、ポリペプチド存在下で得られた吸光度測定値が、ポリペプチド来存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値値から 1以上の復準偏差をもつとき、囮害が有意に起ったと考えた。 14.2節位イライザ法による身体サンプルにおけるhuTF検 出

血液、血素、嗅液、尿、その他の身体サンプル中のカロTをは、同じhロTP分子に同時に結合することができる2つのモノクローナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ポリスチレンUE96次プレートを、まず、各ウェルに、TBS中10月8/m2に希釈した1gG100月8年入れ、ついで、ウェルと、IgG溶液との浸触を、イで、一晩複符することにより、ヤギ抗マウス1gG (ベーリンガーマンハイム社)でコートした。そのウェルを、TBSで3回洗浄し、ついで、

が h u T P に同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ変えることができる。例えば、第 1 抗体として、T P 9 - 6 B 4 を用いたとき、T P 9 - 1 D 1 2 を、T P 9 - 1 O H 1 O の代りに、第 2 の抗体として用いることができる。このように、本発明は、本検定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考案した。15、全プレ h u T P h コード配列を含む D N A 断片の構築

全プレカロTFコード配列を含むDNA断片を第11図にその制限地図に示されている、植換えプラスミドロCTF64、pCIP603及びpCTF314と、この分野でよく知られている操作を用いて構築することができる。例えば、マニアチス(Hanistis)等、NY州、コールドスプリングハーパー、モレキュラー・ラボラトリー、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニング(1983年)参照。

第11図で示されている組換えDNAプラスミド中に含まれる 挿入断片は、クローニングを可能にする、各末頃のEcoRlリンカー5′ーGGAATTCCー3′(MA州、レキシントン、コラボラチブリサーチ社)を有している。これらのリンカー配列は、天然の カロTPN DNAコード配列の一部ではないので、第2図に示されるヌクレオチド配列中には存在しない。組換えDNA分子構築の説明は、関係するhロTFN DNA配列についても明らかなように、EcoRI末端を含む消化により生じ、これらの付加的なリンカー配列を含む断片は、第2図で示したヌクレオチド塩基番号によって示されるだろう。この衝片は、その末端にこれら付加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミドゥCTF64を、制限エンドスクレアーゼEcoRI 及びDramで消化し、第2回で示される、塩店残済1~296番 に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。このよ 各ウェルに、3%BSAを含むTBS/トリトン100glを加えた。その後、これらのウェルを1時間、3 7℃に維持してから、TBSで3回洗浄し、さらに、遇刺の液体を7スピレータで除い

第1のハイブリドーマ、TFS-6B4由来の抗トロTP抗体 分子含有培養上清100mlを含うェルに入れ、1時間37でに 維持した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、ついで過剰の液体を、アスピレータで除いた。

例9で調製したように、免疫観和性単能し、アセトン比較化 huTFを、TBS/トリトンに溶した。このhuTF溶液の発 取物をTBS/トリトンで5pg/mgからQ5ng/mgの範囲 で調製し、希釈液100pgをイムロンプレートのウェルに入れ た。このhuTF常釈液を、第1の放体と接触させ、1時間37 でに減持した。さらにこの希釈物をウェルから除き、ウェルを TBS/トリトンで3回洗浄した。過剰の液体をアスピレータで 除いた。

抗AuTF抗体を、例でで述べた方法により、第2のハイブリドーマTF9-10H10の腹水からMAPSで単離した。この抗体溶液のタンパク質を測定し、ついて、例13で述べたようにピオチン化によりラベル化した。

このビオチン化した抗トロTF抗体をTBS/トリトンで60 ng/mをに着収し、この溶液100gををキウェルに入れた。 そのウェルを1時間、37mに維持し、ついでTBS/トリトンで3回流った。

この結合した、ピオテン化抗AuTP抗体を、例13で述べた デテクI-alk システムを用いて検出した。この検定法で第1及 び第2の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その2つ

うにして作った、302ヌクレオチド塩基対 (bp) 断片をアガロ ースゲルを用いたサイズ分面により具雕し、アルカリホスファタ ーゼを用いた処理により脱りン酸化した。

プラスミドPCTP403を制限エンドスクレアーゼEcoRlで消化し、第2図の残器776~1125番に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。生成した352bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分演により単細した。

プラスミドp CTP 31 4を、制限エンドスクレアーゼ EcoRIで消化し、生成した6 4 7 bpの断片をサイズ分面で早離した。この断片は、第2回の残器135~775番の配列に対応するスクレオチド配列を含んでいる。647 bp断片をサイズ分面で早離し、アルカリホスファターゼで取りン酸化した。

この352bp断片及び脱りン酸化した647bp断片をT4DNAリガーゼの反応によって機能的に結合(ライゲーション)し、第2団の残落135~1125者に対応するスクレオチド配列を有する959bpの断片を作った。

さらに、この999bp斯片を、制限エンドヌクレアーゼ Dramで消化し、第2図の残落296と297春の間でこの999bb斯片を切断し、これによって、168bpと831bpの断片が生ずる。さらに良サン酸化した302bpの断片と、831bpの断片をT4DNAリガーゼで機能的に結合し、第2図の1~1125をに対応するスクレオチド配列を含む1125bp断片を作った。

EcoRIで演化して、クローニングプラスミドベクターpUC 8を課状にした。先に調製した1133bp断片と、EcoRI情化 したベクターをTADNAリガーゼで機能的に結合して環状組換 えDNA分子pUC-プレトuTPhを作った。

大陽菌RR1株・IMD州、ゲイサーズパーグ、ベセスダ・リサ

平成 7.12.20 発行

ーチラボラトリーズ)を p U C ープレト u T F h で h ランスホーム し、 そして アンピッリン 耐性に 基づい T 、 h ランスホーマン b を 選択した。 それから、 この 選択した h ランスホーマントを p ローン化し、プレト u T F h 構造 遺伝子を もつ 超換え D N A 分子の 存在により スクリーニング した。

プレトuTFト構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスホーマント由来のrDNAをBcoRIで消化することによって行った。生じたBcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分解した。352bp、781bp及び2682bpのDNA断片に対応する三つのパンドパターンを示す組換えDNA分子でプレトuTPト構造遺伝子の存在を確めた。上述のBcoRI消化パターンを生ずるrDNAを有する大遇関RRIトランスホーマントは、本発明の組換えDNA分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

細胞外アンカー領域を含むが、カルポキシル宋崎にトランスメンプレン・アンカー領域を欠く、プレカロTPカコード配列の実質的領域を含み、従って、可溶性カロTPカタンパク質をコードするDNA断片を次のように構築した。

プラスミド P C T P 6 4 を制限エンドスクレアーゼ E coR 1 で 清化し、第 2 図の1~4 8 6 香の残茎に対応するスクレオチド 記列を含む D N A 断片を作った。このようにしできた 4 8 8 b p の 断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、その後、アルカリホスファクーゼ処理で取りン酸化した。つぎに、このように減りン酸化した 4 8 6 b p の 断片を切断し、第 2 図の 2 9 6 替と 2 9 7 香の間の部位で、4 8 6 b p 断片を切断し、2 9 6 b p 及び 1 9 0 b p の 断片とした。この 2 9 6 b p の 断片をアガロースゲルのサイズ分画で単級した。

(1983年)) の方法に従がい、互いにオリゴヌクレオチドが 機能的に結合するのを防ぐため、ポリヌクレオチドキナーセによ りリン酸化を行なわれなかったこと以外は同様にして、

- 5 ' AATTTAGAGAATAAGAATTCGGG 3 ' RU
- 3 ' ATCTCTTATTCTTAAGCCC 5

の配列をもつ、合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作った。このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着 E co R 1 末端を含む二本線 D N A リンカー断片を作り、ローザースタイン(Rotherstein)の方法(メソッズ・イン・エンサイモロジー(Hotheds In Enzymol.)、68巻、98頁(1979年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリンカー断片を、p U C - ブレh u 1 P h - Tから得た775 bp断片に凝縮的に結合し、775 bp断片の各末端に1つのアニール断片を含む817 bp断片を作った。その後、この817 b p 断片をE co R 1 で消化し、817 bp 断片とした。この805 bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単対した。

クローニングプラスミドベクターpUCl8をEcoRIで消化 し課状化した。先に调製した805bp断片とEcoRI消化したベクターをT4DNAリガーゼを用いて概能的に結合し、環状退換 えDNA分子pUC-プレカッTPカーTRとした。

大調度RRIをpUCープレカロTFカーTRでトランスホームし、pUCープレカロTFカーTRを含むクローンである、アンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

16. 組換えトロTFトコード配列の発現に反トロTFトの生産 組換えDNA分子由来の超換えトロTFトの発現は原族性相由 細胞、非常機再族性細胞及びより高等な(脊椎)直体性細胞を会 プラスミドPCTF314を制限エンドヌクレアーゼEcoRJで消化し、第2回の135~715巻の残益に対応するヌクレオチド配列を含むDNA断片を作った。この641bo断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で卑耐し、ついで、アルカリホスファクーゼ処理により設りン酸化した。この設りン酸化した641bp断片を、Dramで消化し、第2回の296巻及び297巻の前の部位で、この641bp断片を切断し、これにより、162bp及び479bpの断片とした。このうち、479bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により単超した。

上述のように調製した296bp及び479bpの朝片を、T4DNAリガーゼを用いた反応により機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の1番から775番の配列に対応するメクレオチドアダプター配列を有する775bp断片を作った。

クローニングブラスミドベクターpUCI8をBcoRIによる 調化で観状化する。上記のように顕認した175bp 断片と、 BcoRI消化ベクターをT4DNAリガーゼで機能的に結合し、 環状組織えDNA分子pUC-プレカuTFカーTを作った。

大陽関RR1を、pUC-プレトロTFトーTでトランスホームし、pUC-プレトロTFトーTを含むクローンであるアンビンリン耐性トランスホーマントを選択した。

超換えDNA分子pUC-プレhuTFh-TをBcoRIで構 化し、生成した775bp断片をサイズ分面で単離した。

カルーザース(Caruthara) 等(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. An. Chem. Soc.)、103巻、3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等(コールド・スプリング・ハーパー・シンポジウム・クオント・パイオロジー(Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.)47巻、393

む種々の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の 代表例には、各々、大語図S. セレビシアエ(cerevisiae)及び チャイニーズハムスター明単 (CHO)、調度がある。

a. 大騎国におけるプレトロTFhの発現

大場窗において、プレトuTFが構造遺伝子を発現できる退換 えDNA分子は、例15で作ったpUC-プレカuTFト組換え DNA分子由来のプレトuTFト遺伝子合有DNA断片を単輝し、 ついで、この断片を原核性発現ベクターに複雑的に結合すること により銀換することができる。

組換えDNA分子pUCープレトuTPNを、そのプラスミド中に存在するBcoRI部位を部分的に切断するような条件で、BcoRI補化する。この部分請化法は、アニアテス(Haniatls)等、NY州、コールドスプリング・ハーバー、コールドスプリングハーバー・ラボラトリーズ、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニングにより詳細に報告されている。図2の投
しきから、1125番で示される配列に対応するスクレオチド配列を含む1133bp断片を、サイズ分面によりBcoRI部分分解
激物から単類した。

原核性発現ベクター p K K 2 2 3 - 3 (N J 州、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミコルズ社)を、Eco R I による情化で級状化した。この情化ベクター及び l 1 3 3 bp プレ b u T P h 構造遺伝子合有断片をT 4 D N A リガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換え D N A 分子 p K K - プレ h u T P h を

大路間RR 1 を p K K ~ プレトロ T F h で トランスホームし、 p K K ~ プレトロ T F h 含有クローンとしてアンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

## b. 大路車におけるhuTFhの発現

大場面において h u T P 遠伝子を発現することができる観点え D N A 分子は、例 1 6 a で調製した 1 1 3 3 bp断片を操作して課 扱した。まずこの断片をT ルカリホスファクーゼで説リン酸化し、 ついで、制限エンドヌクレアーゼ B bv J で消化した。生じた984 bpの断片は、第 2 図の経路 1 6 4 ~ 1 1 2 5 番に対応するヌクレ オチド配列を含んでおり、サイズ分画により単離した。 集に述べたように、

5'-ANTIGACATGTCAGGCACTACAAATAGTGTGGCAGCATATAATT-3',

3'-CTGTACAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTG-5',
の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作り、ロサースナイン(Rotheratela)等(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Hethods in Enzymol.) 68巻、98頁(1979年))の方法に従って、枯着BcoRI及びBbvI末端を合む二本額・DNIリンカー断片をアニーリングすることにより作った。このリンカーをまず964bp 断片に機能的に結合して、1008bp 断とした。ついで、1008bp 断片を、T4DNAリガーゼを用い、EcoRI補化したベクターpKK223-3と機能的に結合し、運転扱換えDNA分子pKK-huTFhを作った。

超換えDNA分子 pKK-buTPhは、pKK-プレ buTFh と、(1)残器 1~128番の残器がない、及び関新しいメチオニンコドンが、残器 130番の前に機能的に結合しており、その結果 クンパク質発現 (翻訳) が押入されたメチオニンコドンの場所で 始まることだけが異なる。

組換えDNA分子 pK KープレカロTF h及びpXX - huffh を、その中に含まれる構造遺伝子によりコードされるカロTFカ

た。それからこの選択したトランスホーマントをクローン化し、 モノクローナル抗体TF8ー5G9を用いて、発現するプレ ねuTFhタンパク質の存在を各クローンについて独定して、 pSVープレルuTFhの存在に関する退択を行った。 d. CHの細胞におけるhuTFhの発現

本乳類相随において、huTFhhを発現することができる組換 えDNA分子を、例16c由来のpSV-プレhuTFhを、制 限エンドスクレアーでBellで消化することにより構築した。生 成した1153bp 断片をサイズ分面で卓離し、つづいて、制限 エンドスクレアーでBbv!で消化した。生じた974bp 断片は、 図2の残器164~1125番の配列に対応するスクレオチドア ダブター配列を含み、これを、サイズ分面により単配した。 先に述べた方法で、

5'-GATCGACATGTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT-3',
R U

プラスミド発現ベクター pKSV-10を、Bs10で消化して 鍵状とし、ついで、T4DNAリガーゼを用いて、1018 bp 断片に肉能的に結合し、歴状組換えDNA分子 pSV-boTF b を作った。

組換えDNA分子 pSV-プレカuTPカ及び pSV-hoJFb

平成 7.12.20 発行

又はプレトロTFトの発現に適合する原数性宿主媒体に導入した。 そのような宿主媒体の代表例は、大鷦躅RRI株である。この宿 主を、組銭えDNA分子でトランスオームし、細胞増殖とこの緩 級えDNAの発現に適合する条件下で培養し、この発現したタン パク質を従来の技術を用いて収穫した。

c. CHO細胞におけるプレトロプタトの発現

脊椎動物細胞中、プレトロTPト連伝子を発現できる組換え DNA分子を例16aで興製した1133bp 断片を用いて構築 した。

カルーザース ( Carathera )等及びゲイト ( Galt ) 等の方法 (上記) を用い、

5 ' - AATTCCCGGG-3', MO

5'-GATCCCCGGG-3'.

の配列をもつ合成オリゴスクレオチドアダプター断片を作った。 ついでこのオリゴスクレオチドアダプター断片を、ロザースタイン ( Rotherstein )等の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー ( Methods is Enzymol. )68巻、98頁(1979年))を用い、1133bp 断片の各末端に結合し、元々1133bp 断片に存在するBcoR 1 枯着末端を、Bgl I 私着末端に転換した。

真抜性シミアンウイルス (SV40) を基本とする発現ベクター、pKSV-10 (NJ、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、制度エンドスクレアーゼ Bell Eによる消化では状化した。 1133bp のBell 通合断片及び、Bell I情化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、環境的に結合し、環状経緯えDNA分子 pSV-プレカロTF hを作った。

大馬図RRIを、 pSV-プレトuTFトでトランスホームし、 アンピンリン耐性のトランスホーマントを選択し、クローン化し

を、内在する構造遺伝子によりコードされるhuTFh又はプレ huTFhタンパク質の発現するのに適合した実体性宿主媒体中 に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CHO 細胞がある。

宿主を、超換えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトランスホーマントを従来法で選択した。例えば、グラハム(Graham)等、ピロロジー ( Virol.) 、52巻、456頁 (1973年)及びサウザーン ( Southern )等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス ( J. Mol. Appl. Geael.)1巻、327~341頁 (1982年)参照。トランスホームした宿主細胞を、細胞増殖及びその緩偏えDNA発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収穫した。

■、イーストにおけるプレカュTFhの発現

S. セレビシアエ ( cerevisiae ) において、プレト u TPh 遺伝子を発現できる経験え D'N A分子を、先に述べたように、

5 ' - A A T.T C.C C G G G - 3 ', RO

· 5.' - CCCCCGGG-3',

の配列をもつオリゴヌクレオチド、アダプター断片を合成し、ついて例16 aの i 133 b p 断片の末端に、それを結合することにより構築した。このようにして作ったアダプター化した断片は、Clai粘着末端をもつ。

・イーストの発現ベクター、 pTDT1 (アメリカン・タイプ・ティシュコレクション、 # ATCC31255) を、 関限エンド ヌグレアーゼClaiでの消化により級状化した。上記のClaiア グプター化1133bp 断片及びClai消化ベクターを、T4 DNAリカーゼを用いて、保能的に結合し、環状の組換えDNA 分子ョソープレカロTFカを作った。

大陽関RRIをプレトuTPトでトランスホームし、プレ トuTPト構造遺伝子を発現するトランスホーマントを、例16 cで述べた方法により同定及び選択を行った。

### ・1、イーストにおけるhuTPhの発現

S. セレビシアエ (corevisiae) において、huTFh構造 遺伝子を免現できる退放えDNA分子を、pY一プレhuTFh の Claiによる情化により、第2回の残益1~1 125番の配列に対応するスクレオチド配列を含む1151 bp 断片を作ることで構築した。サイズ分面による単類後、1151 bp 断片を目がよい。第2回の残益164~1125番の配列に対応するスクレオチド配列を含む978 bp 断片を作った。この978 bp 断片は、サイズ分面により単難した。

5'-CGGACATGTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT-3',

## 及び

3'-CTGTACAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTG-3',

の民列をもつ合成出リスクレオチドアダプター断片を作り、先に述べたように、アニールすることで、Clal及びBbv I 粘着末端をもつDNAアダプターを作った。まず、このアダプター断片を、 578bp 断片に領鍵的に結合することにより、1020bp 断片とした。つづいて、この1020bp 断片を、T4DNAリガーゼを用い、例15cで述べられているように興製したClal指化pTDTIベクターと結合し、環状組換えDNA分子pY-huTFbを作った。

超換えDNA分子 pYープレルロTF h及び pYールロTF h を、内在する構造遺伝子によりコードされるカロTF h又はプレ h u TF h タンパク質の発現に適合するイースト宿主媒体中に導

17. ポリペプチド p2 4 - 3 5及び p1 5 9 - 1 6 9による凝集 阻害

第7表にそのアミノ酸残益配列を示した例11で述べたように 合成した。

## 第 7 资

ペプチド名 o24-35 アミノ酸残薬配列

. .

H — EMERKAANDAĄ1 — OH

p 1 5 9 - 1 6 9

H - ITTLYYHKSSSSGKKTAK - OH

a. 各ポリペプチド実験名は、第1回に含まれているアミノ放発 基配列を表わしている。

それから、ポリペプチド p2 4 - 3 5 及び p1 5 8 - 1 6 9 に ついて、例1 2 で述べられているように、 h u T P による 製集 関 始を 競合的に 国客する 鏡力を 検定した。 この 研究の 結果を 第 1 2 図に示し、 p2 4 - 3 5 及び p1 5 9 - 1 6 9 は、 1 0 p M 沿皮 で用いたとき、 各々、 h u T P で 開始した 愛魚を、 4 5 % 及び 2 5 % 国客できることを示している。 この 研究において、 第 1 2 図で 白丸によう示したこれらペプチドに 対する 国客 バックグランド は、第 4 漢で示した 実験 結果よりも低いことに 注意しなければならない。 結果として、 この 研究において、 1 0 μ M 渡皮での 敬 無 国客を 少なくとち 2 0 % 起こす ポリペプチドは、 h u T F 結合 砂位 ポリペプチド類 収物と 考えた。

従って、ポリペプチド p2 4 - 3 5 及び p1 5 9 - 1 6 9 は本発明の h u T P h ポリペプチド結合部位類似物を示している。 皮た、ポリペプチド p2 5 - 4 9 で得られた同様の結果を考慮すると、 p2 4 - 3 5 で得られた結果は、 h u T F h - 因子リンド a 結合部位は、これら 2 つのポリペプチドの共通部分、すなわち、

平成 7.12.20 発行

入した。このような媒体を含む宿主知题の代表例には、S. セレビシアエ ( cerevisiae ) 招盟がある。

宿主的数を、この組換えDNA分子でトランスホームし、選択 培地で培養して、従来法により、トランスホームした知路を単離 した。例えば、ハイネン(Binnen )等プロシーディング・ナシ ェナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. )USA、75巻、1929頁(1978年)及び、ミヤジ マ ( RiyaJina )等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオ ロジー ( Hol. Cell. Biol. ) 4巻、407頁(1984年)参 照。トランスホームした細胞を、細胞増殖及び組換えDNA発現 に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を従 来法で収穫した。

5. 組換えねゅでドカコード配列の発現による可溶性なってドルの中間

超校えDNA分子からの可溶性huTFhの発現は、プレ huTFh及びhuTFhに対し、例18で述べたのと同様に、 健々の発現媒体で行なわれた。その例において、BcoRl結構来 端を有する所片を含む1133bpのプレhuTFh構造運伝子 の例16aでの作成と、つづいて、例16b-fでの操作で、大 時間、S. セレビンアエ ( cerevision ) 及びCHO結婚の3種 の発現媒体において、プレhuTFh又はhuTFhを発現でき るベクターを作った。関係に、EcoRl結構来鳴を有する可溶性 プレhuTFh構造運伝子を含み、例16aで調製した805hp の断片を例16b~「で述べた方法に継がって機作し、これら同 発現媒体中可溶性プレhuTFh又はhuTFhを発現できる発 現ベクター(すなわち、プレhuTFh-TR又はhuTFh-TR)を作った。

第1回で示した残蓄30~35、 (-VNQVYT-) のアミノ 設残基配列で作られていることを示していることに注目すべきで ある。

18. 抗カルTF抗体による凝集阻害の速度論

抗 h u T P 抗体が、 h u T P の 森 集 開 治 を 阻 客 できる 時間 を 謝 定する ため、 この 阻 等の 時間 経 過 を、 例 1 0 で 述 べ た 限 客 検 定 法 を 用 い て 頻 定 し た。

例1で述べたように調製した、MAPS早離化TP8-5G9年ノクローナル抗体およそ1ng.を、100mgHBS/TBS中、例4で述べたように閲製した再覧質化huTPおよそ1ngと混合した。このように形成した減々の混合物を、17でで、約1から60分の間の種々の時間維持し、抗huTP抗体を、AuTPと免疫学的に結合させ、免疫反応度物を作った。第13図で示した時間に、各混合物について、例2で述べたように、huTPの凝血活性を検定し、ついて、例10で述べたように限害率を示した。

無13回で、このような速度論的測定の結果は、この検定で用いた抗体及び特製した h u T P の過度で、65 M 以上の h u T P による 凝集開始の 阻害が、10 分以内に起こることを示すことがける。より高い抗 h u T F 抗体減度では、より速く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗トロTP抗体による、トロTPによる凝無関始顕著の投与 一応体

抗体投与範囲にわたる、トロTF 凝集開始を阻害する本発明の抗トロTP抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により 検定した。例 4 で调製した再脂質化トロTF1ng を、0.1 ng のHBS/BSA中、例 7 で述べたように単輝した、種々の豊の TF8-5G9モノクローナル抗体と混合した。このように問製した混合物を維持して免疫反応虚物を作り、つづいて例10で述べたように、huTPの磁血活性に関する独定を行った。

そのような投与一応答検定の結果を、第14回に示し、また、このことはこの研究で用いたドロTF隣皮に対し、 m 2 当り、およそ 1 ~ 5 m m の抗 h u TFでの最高値の半分の阻害を示している。

同様の投与一応答実験を、カロTP減として溶解したヒト知識 を用いて行なった。

セトの機謀李和西不列CM133 ( ( N 1 G M 5 ヒューマン・ジェネチック・ミュータント・セル・レポジトリー) を、2 m M グルタミン、5 % ウン胎児活性及び抗生物質を描った、ダルベコ体正イーグル培地 ( D M B M 、 N Y 州、グランドフィランド、ギブコラボラトリー) 中、3 7 ℃で、7 % ( \*\*/\* \*) 二改化炭素空気雰囲気下で培養した。G M 1 3 8 1 細胞を増殖し、そして収穫し、さらに3 0 × 1 0 \*\* 個の細胞のペレットを進心で調製し、一7 0 ℃で凍結した。この凍結ペレットをH N バッファ ( 2 5 m M へペス、1 4 0 m M N = C 2 、 p H 7.0 ) 中の 1 5 m M ペータ、オクチルグルコピラノシド溶液 9 m 2 を加えて色速に配解し、さらに1 0 分間 3 7 ℃に維持して、細胞を溶解した後、H N 1 8・m 2 を加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル抗化TP8~5 G 9 を、第15 図に示した様々の投与に対し、0.0 1 % B S A (シグマ、RIA級)で希釈した。それから各抗体器釈勃 2 5 μ & に、先に調製した細胞溶解物 2 2 5 μ & を加え、6 0 分間 3 7 にに保って、抗体を細胞溶解物中に存在する h u TPと免疫反応させ、免疫反応度物を形成させた。その後、2 5 m M CaC & ,

ーション混合物100μ & を、50μ & のヒト因子 N 交換血漿及び50μ & の50m M CaC & 。に添加することにより測定した。37℃、1分後、相関権の血清の10倍粉収物50μ & を因子 N 確認として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24個のM。Abのうちの18個がパブーン高TF又は、アフリカ・ミドリザル腎尿相胞抽出物のプロコアグラント活性を阻害した(第8表)。しかし、M。Abのいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、羊又はブタのTFと、交差反応を示さなかった。すなわち、相同的因子で減の存在下、ヒト因子で欠失血漿のリカルシフィケーション時間促進能を示すTF磺製物ではなかった。抗体のいずれも、正常なヒト血漿での検定による、ウサギTFのコアグラント活性を示さなかった。

平成 7.12.20 発行

50 μ 2 を、免疫反応産物を含む溶液 50 μ 2 と混合し、ついて、 50 μ 2 のクエン酸化ヒト血漿と混合し、設無を開始させた。このようにして作った混合物を37 でに維持し、血法の添加と、破血形成の間の時間を測定した。効果的 h u T P 速度及び関害率を例10 に述べたように計算した。

トロTF可として、ヒトGMI381 田勘溶解物を用いた役与一応答問を検定からの結果を、第15 図に示した。これらの結果は、TP8-5 G9 抗トロTF 放体が、 mg 当り、およそ8-10 ng の放体線度でトロTFのこの細胞溶解癌の半分の限害を起こしたことを示している。

## 20. 非ヒト組織因子とMoAbの交差反応性

組織因子を、脳組織(ラット、ラピット、子のシ、イヌ、羊、ブタ及びヒヒ)又は、組織均養複数(アフリカミドリザル腎臓(COS)組数)から単離した。組織又は相应を散解し、腰をはぎ、ミンチし、組織Ⅰェ当り、1m4の冷アセトンやでは逃した。この固体をアセトンに感激し、もう5回鍵逃し、一乗空気を促したのち、-30℃で保存した。開始温量量の16~19%を合むアセトン粉末を組かくしてから、5mm01/18DTを含むでBS中、5%( w/ャ )となるよう無悪し、変温で1時間混合した。10.000×ェ、20で、30分間の違心で関係を集め、ついて下を有限を100.000×ェ、1時間の上宿の違心で集めた。このベレットを、TBSに懸測し、-80℃に保存した。

動物TP(TP活性をもつ超級権抽出物)による抗体障害を、次のように関定した。等容量のTP(1 m/sl)及びハイブリドーマ上请(TBS/BSAでの10倍条駅物)を、37でで2時間インキュベートした。残存するTP活性を、そのインキュベ

第 8 表

		RIA	F+ }	9133	>ブリット		字》	動物
Modb	717917	(cpm)	ブロット	R	¥R.	凝血,	м.	の阻害
TF8-5C4	IgG1. #	5242		±	,	96	57	
TF8-5G9	IzG1. #	28587			÷	99	80	
TF8-1101		29453	•	-	÷	99	82 -	•
1F9-1F1	Ig61, #	25133	•	•	+	95	83	n. 3
TF9-105	1:61. #	3872	. +	+	+	95	76	n.3
TF9-137	IgG1. #	28586		+	+	97	90	n. 3
TF9-188	izGi, #	28552	+	+	+	98	83	n. 3
TP9-189	IgG1. #	28523	+	,	+	97	84	n. 3
TF9-2C4	· IgG1, #	24435	+	+	*	97	78	п. 3
TF9-2F5	TaG1. A	27422			•	97	79	n. 3
TP9-4011	1 z G ] . #	25994	. +	٠	+	97	81	Ħ. 3
TF9-564	IgG1, #	24073	•	•	ŧ	97	83	n. 3
TF9-5B7	lgGl, ≪	25819	+	+	,	97	74	n.3
1F9-5C7	isGl. K	24543	+	+	•	95	72	н. з
TF9-684	IgG1. #	17894	+	+	+	96	98-	n.3
TF9-6G4	IgG1. #	24065	•	•		95	78	n.3
F9-5C9	łęGI, z	8054	+ *	+		95	47	
FF9-7E10	1 #61. '#	8025	+	ŧ	+	97	54	
199-823	[26], #	29152	+	•	+	97	76	a.3
F9-9E1	1261, #	18169	+	+	<b>.</b>	90	71	n.3
79-9C3	igG1, ∉	30222	+	•	+	97	82	n.3
F9-984	leGl, #	33728	+	+		95	82	И.3
F9-10C2	IsG1. #	28692	+	+	+	98 -	71	n.3
P9-10H10	Ie61. #	24585	• •	٠	+	0	20-	
Ab100	IsG, x	1929				٥	0 *	

- 2. 選元 (R) 又は非選元 (NR) のTFを用いて行ったウェス タンプロット。
- 3. 特越したヒトのはTFによって誘導されるヒト血鉄の凝結の 脚端。
- 4. J82相数に対する特異的 '\*\*1 因子以/以\* 結合の阻害。
- 5. 組ヒヒ協抽出物 (B) 又は溶解COS想聴 (M) により誘導されるヒト血張凝集阻害。 M。 Ab が 8 0 %以上の凝血液性を 阻害するとき、文字がその様の場所に入れられている。

植 \* のヒト制助及び組織により発現される級血活性の阻害をMoAbTP8-5C9を用いて詳細に試験した。TP8-5C9は、I8G3度≥1月8/18/20ときの90%以上、精製再類質化したヒトTPの機能を中和する(第18図)。ヒトの招胎溶解物及び租組機抽出物の級血活性を阻害する、このMoAbの能力も示されている(第9度)。10月8/18/20ほどでのTP8-5C9は、租12及び胎盤のTセトン粉末及び溶解したヒトの線理芽細胞、膀胱がん細胞及び内毒素活性化末梢血液単核細胞の凝血活性の80%以上を定量的に阻害する。

ナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Bloj. Chem.)、262巻、11692 (1987年)。 従って、相胞表面 haff: VI/VI a 複合体会合に関するM o Ab の効果は、J82 細胞を、抗体とプレインキュベートし、さらに、 '\*\* i - 図子VI/VI a の 特異的結合を定量することにより試験した。

」82細胞を12穴培養プレート中、フェア(Fair)等によ って報告されているように(上述)、集密化するまで培養し、パ 777A (137mM NaCa, 4mM KC4, lin mol. Lーグルコース、5mMアジ化ナトリウム、10mMへペス、 pH 7.4 5) で洗浄し、ついで、精製したMoAb IgG又は、 ハイブリドーマ培養上清10倍希収物を含むパッファA0.7mg とともに、37cで2時間インキュベートした。塩化カルシウム 及び、1801~因子はノほるを各々、最終濃度5mM及び1mM となるよう添加し、さらに31℃、2時間インチュベートした。 その後、相胞単層を、冷パッファB(140mM N·m C t 、0.5 %BSA、5mMトリスHC&、 pH7.45) で5回洗浄し、i neの0.2M NaOH、1%SDS、10mM BDTA溶液中 で溶解し、その溶解物のガンマ級をカウントした。特異的結合は (非ラベル因子WI/Waを100倍過剰存在下、知路と会合する !\*\* [因子VI/VIa)、非特異的結合放射活性を表し引いて測定 した。特異的結合の阻害平は9容のバッファスと、1容の培養培 地で処理したコントロール細胞に対する、M o Ab で処理したり

因子リノリッがTFに結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合によるTFインターナリゼーションの可能性を はくため、J82和数を、5mMフジ化ナトリウムで代謝的に乗 致した。胡散のアジド処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ

## モノクローナル抗体TP8-5G9による、 類々の制防及び組織の磁血活性の阻害

TP賃性源	が体なし	P語	<b>生(%</b> )	題書)	3-569
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	0.440	rau,		•••	
接製ヒト間TF	1569	1520	(22)	245	(B4X)
粗写抽出物	2059	2059	(02)	411	(202)
租胎盘抽出物 ·	1287	1344	(02)	159	(883)
CN1381機維芽細胞(溶解化)	990	966	(23)	143	(861)
ヒト単球 (溶解化)	2893	2745	(52)	178	(94%)
J82 膀胱がん細胞(溶解化)	882	902	(01)	93	(891)
<b>ウサギのトロンボプラスチン</b>	2106	2108	(01)	2157	( 01)

- 1. 特製したヒト扇丁ドを、テスト前にリピロトピヒクルに再構。 成した。
- 2. 右の2つの間は、指示されている物語!&Gで処理した後例 定した、ミリユニットで表わした残留TP密性の2回の平均値 が示されている。残存するTP密性の測定的、サンブルを37 でで20分間、10g € ノ = &の1 &G とインキュベートした。 カッコ内の値は、沈休なしの同サンブル管性ユニットに対する 阻容率が示されている。

## 21. 因子切結合の研究

因子サノVI。のTPへの結合は、機能性TP:VI/VI。凝集促 遠猿合体の集合に必要とされるので、因子VI/VIaのTPに対す も結合を妨げることによる、第8支に示したMoAbのTP活性 中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子 Me の J 8 2 の膀胱がん細胞表面への結合はよく関べられている。フェア( Fair )等、ジャー

t.

での研究の特別は、上の第8数に示されている。TF活性を阻容する全ての23個のM。Abは、因子リンリョ結合も限事した。予想されるようだ、TF活性を関害しないM。Ab、TF9-10H10は、因子リの結合を限害しなかった。

## 22. J82細胞による因子Xュ形成の阻害

J82組胎上でのhuTP: VI/VIa 複合体による因子Xa形 成速度を、次の作正をした、フェア ( Fair ) 等(ジャーナル・ オプ・パイオロジカル・ケミストリー ( J. Blot. Chem. ) 、 262巻、11692頁(1987年))により報告された、多 穴培養プレート検定法を用い 2 度定量した。相助を、12 穴プレ ート中で培養し、J B 2 組励への因子はJVI a 結合の際に上述し たように、校定開始前、推々の譲皮の精製した、MoAb のIs C **適分と37セで2時間プレインキュベートした。単一の湯度の因** 子VI/VIa(lnM)を検定で採用した。因子Xを最終濃度50 μαノα1となるよう添加した後、5、10、15分の間隔で、 5 0 μ A の上清を探取し、5 5 0 μ A の 5 0 m M トリス・HC A 、・ に入れた。発色性因子Xa基質添加後(TX州、ビューモント、 ヘレナラプ社、3.4mM S-2222 50g 4) 、適度論的分 祈モジュールをつけたペックマンDU-30分光器で405nm の吸光度の増加を測定することにより、因子×の活性を定量した。 因子は/11 a 非存在下でインキュペートした」 8 2 拍脑上波のS - 2 2 2 2 加水分解によるバックグランドを各測定値から差引い た。抗体処理の阻害率は抗体とのプレインキュペーションなしの 起腹に対して計算した.

M o Ab TF 9 - 2 C 4 及びTF 9 - 5 B 7 による J 8 2 細胞

発行

の処理に対する図書曲線は、因子Xa 形成速度が、因子 Y 結合を限害したものと同様の抗体速度で限害されることを示している(第17図)、非限害的(非中和性)Y MoAb Y P Y P Y D Y H Y 社 Y B Y

23. huTFhポリペプテドの因子は/Waへの競合的結合による、J82和数上での因子X活性化の顕著

当分野ではよく知られているように、孤血促進プロテアーゼカ スケードの相談活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる種々の病 気と関連している。一般に、凝血促進プロテアーゼカスケードは、 腱シャプター及び基本的共因子、組織因子 (TP) に対する因子 W/Waの高い観和性による発見により、細胞を固で開始する。 TP及び因子は人切 a の二分子器直径送往会体 (TP: ほノVia) は、最終的にトロンビン形成及びフィブリンの折出につながる限 定したタンパク質分解による因子X及び双の活性化を起こす。さ らに、森立におけるTPの役割、TPによる延集プロテアーゼカ スケードの開始は、損損性血管内疑固及びトロンポジェネシスと「 関連する。ニーメツ ( Hismetz )等、ブラッド ( Blood ) 4 2 地、 . 4 7 頁(1 9 7 3 年)及びベビラクナ( Bevisacqua ) 等、ジャ ーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン( J. Exp. Hed.) 、 160毫、618頁 (1984年)。 TFは、炎症性仲介物に対 する応答及び細胞性免疫応答で、単雄及び内皮細胞の裏面で発現 する重要なエフェクター分子である。

本発明のhuTFhポリペプチドが、因子リン切りに結合し、 それにより、因子Xを活性化することができる、TF:WノWs

第10表 huTFポリペプチドを用いたJ82 細胞に関するX活性化の阻害

<b>カロTFボリベブチド</b>	光学密度「
PBS	0. 9 6 0 ± 0. 0 8 3
因子なノリョなし	0.005±0.001
p 1 - 1 8	1.007 ± 0.087
p 1 - 3 0	1.098±0.028
p 1 1 - 2 8	0. 8 8 7 ± 0. 0 7 1
p 2 4 - 3 5 .	0. 4 7 7 ± 0. 0 1 7
p 2 6 - 4 9	0. 4 3 7 ± 0. 0 2 0
p 4 0 - 7 1	0. 8 1 4 ± 0. 0 5 3
p 7 2 - 1 0 4	0. 7 8 1 ± 0. 0 4 7
p 9 4 - 1 2 3	0. 8 1 8 ± 0. 0 5 5
p 1 2 1 - 1 5 5	0. 8 8 9 ± 0. 0 6 7
p I 4 4 - 1 5 9	0. 5 0 7 ± 0. 0 5 3
p 1 4 6 - 1 5 7	0. 0 0 4 ± 0. 0 0 1
p 1 5 7 - 1 6 9	0. 3 8 9 ± 0. 0 3 5
p 1 6 I - 1 9 0	0. 6 0 0 ± 0. 0 2 3
p 1 9 0 - 2 0 9	0. 6 2 5 ± 0. 0 3 1
p 2 0 4 - 2 2 6	0: 7 1 5 ± 0. 0 4 2
p 2 4 4 - 2 6 3	0.619±0.047

1. もし、光学機度 (O. D.) が約0.5 0 0 以下なら、因子 X の話性化の阻害は有意であると考えた。

本研究の結果は、huTFhポリペプチドp24-35、p26

- 49、p 1 4 4 1 5 9、p 1 4 6 1 6 7 及 U p 1 5 7 -
- 1 6 9 は、因子VI/VI a に結合し、因子Xを活性化できる、TF
- :リノリュ複合体の形成を阻害することを示している。これらの

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS中、100μMのNuTFポリペプチド類似物を含む溶液50マイクロリットル (με)を、96穴平底ポリスチレン検定プレートの各ウェル96個に入れ、ついでその各ウェルに、例3で述べたように単離した、TBS中1nMの温度に調整した因子ログほのを含む溶液25μεを加え、さらに、TBS中20㎡の体化カルンウム25μεを加え、その混合物を30分間室温に対けした。

ヒト酸酸がん細胞 J 8 2 細胞を、アノリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC HTB1: MD州、ロックビル) から入手し、参考としてここに組込まれているフェア (Pair) はの方法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー)、262 巻、11892-11698頁 (1987年)) に従って培養した。

50 p # の T B S に 5 × 10 4 個の J 8 2 細胞を整備し、上述の維持を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア ( Fair ) 等の報告のように (上述) 単離した、T B S 中 1 0 0 n M の準度の因子 X 2 5 p # 及び、X = 発色基質 S - 2 2 2 2 (1 m / m # T B S) 5 0 p # を加え、流合し、その流合物を 2 分間変温に維持して、発色反応変物を含む将液とした。

生成した発色度物量を、 V - max 9 6 穴スペクトロホトノータ (カリホルニア、マウンテン・ピュー、モレキュラー・デバイス 社) を用い、405ナノメーター (nm) での光学密度 (0.D.) を選定して定量した。ボリベブチドの代りにTBSを用いるか、又は、因子は無添加のコントロールも測定し最高及び最低00位 を決定した。これら阻害の概定結果を第10表に示す。

結果は、本発明のhuTF結合部位ポリペプチド類似物が凝集を 顕客するのに用いることができることを示している。

24. 抗huTFh MoAh による凝集の生体内での観客

しばしば、グラム陸性細菌による腐敗症は、最終的に死に至ら しめるショック状態を起こす。このヘモスタチスシステムの乱れ は、このショック状態の展開と密接に関係している。チイラー (faylor)等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. lavest.)79巻、918~825頁 (1987年))は、外的に加えられた活性化した、タンパク質 C、天然の抗凝血酵素、は、凝集応答及びヒヒにおけるLD。。の の大耳雷濃度の致命的効果を妨害する。

本発明の抗亜無M。 Ab の生体内における最無国客能力を、ディラー( Taylor )等(上述)によって報じられた腐敗ショックのヒヒモデルを用いて試験してみた。 遺さを計った 7 ~8 のヒヒを実験前一晩認まし、実験の朝、ケタミン(筋肉性射、14 年/年)で免疫化した。ついで、ペントバルビタール設テトリウムを、 後皮カテーテルを選し、頭の静脈に投与し、 軽いレベルの外科的麻酔状態に被持した(約45分毎2 年/日)。 大腿部静脈を無調的に露出させ、血液探取の為1方の後足にカニュールを整込んだ。 接皮カテーテルは大腸 宙及び例20で示した、M。 Ab TF9~5 B Tを含む試剤を与え、ヒヒのTFと交差反応させるのに用いた。30分間の平割化時間の後、この動物に約10分間にわたって、M。 Ab TF9~5 B 7 500 μ g / 世又は15 μ g / に (例7で述べたように単離し、ついで無菌生理支塩水に透析し、0.58μ g / μ g / にを与えた。

M o Ab 投与及び30分間の平衡化の後、各動物は、LD;ss

平成 7.12.20 発行

の大場面の投与を受けた(約10°億、投与後約8~16時間で 敗血性ショックのため死をもたらす量である)。大陽面は2時間 に減り往人により投与した。この研究結果を第11歳に示す。

第11表 ヒヒの敗血性ショックによる政死の生体内における風止

グループ	hoab	投与	<b>弱血</b>	大路 閉住 入	死
1 . 3>}0-\$	1F9-587	500	Formal	¥o .	No
1-01cc . I	EB*	500	Normal.	Yes	Yes
班. 实 数	179-587	500	Normal	Yes	Ro
	TF9-587	150	Normal	Yes	No

- 1. 血圧、凝集活性化及びフィブリン分解変物を含む値。のへモスタチスパラメークは、MoAb 投与後、大陽面注入前に測定した。
- HBは、TP9-5B7と同じ類及び亜額のMoAbであるが、無関係の拡張と免疫及応を起こす。

第11表にみられるとおり、M。Ab TP9-5B7を受けた ヒヒはLD:。の大腸菌の役与に対しても生存しつづけた。NoAb 150月8/セ及び500月8/ビの阿拉与で保護された。さら に、コアグロペシーと関係する、顕著な低血圧、凝焦カスケード 符性化およびフィブリンの分解は、M。Ab TP9-5B7を受 けた動物で著しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎮としての、 5 8 kDa カロTPへ テロダイマー経額の特徴

免疫親和性早期したTFをさらにウェスタン・プロット分析で 特性を調べ、5 8 kD h u TFヘテロダイマーの成分、すなわち、 例4で述べた4 7 kDa 及び1 2.5 kDa タンパク質を同定した。

## なるという結論を支持している。

使って、現在、例4で述べられている58kDa ヘテログイマーの125kDa 軽複成分は、ヘモグロビンのアルファ積であり、47kDa h u T F タンパク質との会合は、h u T F 単環操作のアーテファクトであると考えられている。

## 例1~25の結果のまとめと討論

2つの異なる短胞融合体由来の、ヒト間下Pに対する、24種のMoAb ライブラリーについて報じられている。各MoAb の免疫特異性は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。ほとんどのMoAb は、全ての3条件下、ヒトの本来のTP及び変性TPと反応した。MoAb の1つ、TP8-509は、TFタンパク質のルーチンな特質にうまく使用することができる。それは組織抽出物由来のTP高性を吸着し、ミリグラム量の精製ヒトプPを一定して与える

MoAbの1つ以外の全では、精製したヒト脳TFの限義活性を強く中和する。いくつかのMoAbは、ヒヒ及びサルのTFと交差反応をすることが分っているが、相同的因子での存在下、ラット、ウサギ、子ウン、イヌ、草、又はブタのトロンボブラスチンにより開始した因子で欠損ヒト血機の破集を、どの抗体も阻害しなかった。さらに、ウサギ脳トロンボブラスチンによる正常なヒト血族の凝集開始は、どの抗体によっても阻害を受けず、このことは、ヒトTF凝血活性の阻害は、因子で、VI」を含む、可溶性血性凝血タンパク質への抗体の妨害によるものではないという結論を支持する。

抗TPによるTP凝血活性の阻害に対する最も明解な原因は、 因子なノVIの結合のブロックである。予想されるとかり、今部で

上で述べたウェスタンプロット分析の結果は、第18図に示した。飲huTP 1gGは、運元型huTPの47kDaのパンドとのみ免疫反応を起こし、125kDaのパンドとは反応しなかったが(パネルA、レーン3)、一方、同1gGは、非運元型huTPの58 kDa及び47 kDaの関バンドと免疫反応を起こした(パネルA、レーン4)。これらの結果は、58kDaへテロダイマーの47kDa成分としてのhuTPの間定と一致している。 抗ヘモグロビン1gGは、非運元型huTPシンプル中の58kDaパンドとのみ免疫反応を起こし、47kDaのモノマーとは反応しなかった(パネルB、レーン4)。しかし、抗ヘモグロビン1gGは、選元型のhuTPランブル中の125kDaパンドと免疫反応し(パネルB、レーン3)また、125kDaの精製したヒトヘモグロビン・タンパク質と免疫反応した(パネルB、レーン2)。非免疫ウサギ1gGとの反応はなかった。

上記の結果は、非道元型h n T F の 5 8 k D a の分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した 4 7 k D a h u T P から

23個の抗殺血(中和性) M o Ab は、TPの基本的レセプター 領能と一致して、J82細数への因子V/VIaの特異的結合を妨 ぐ。さらに、このことは、因子VI結合及び、因子Xa形成速度の 阻容のハーフ・マキシマルが同じ1gC速度のときに起こる、選 択した特製MoAb の投与演定においても実証される。

ヒトTPに対するMoAb は、最近、カーソン( Carson )等 (プラッド ( Blood )、10巻、490頁 (1987年) ) によ り、これを直接試験したのではないが、因子な/胃:結合の妨害 によることは明白に、TF活性を阻害するものであると報じられ た。21個のここで述べられているMoAbのうちの23個が、 TF活性を強く中和するという知見は注目に値する。 機のヒト級 「血タンパク質に対するM o A b を用いた当出脳者の研究室で行っ た実験は、少敗の割合のものが機能活性を中和するというもので ある。基本的TPとの交差反応性が合む、反応性が各々異なるこ とから、ハイブリドーマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。 さらに、進行中のエピトーブマッピング研究は、この種のMoAb に少なくとも3つの別々の非難合抗体結合部位が確認されること を示している。それゆえ、TPに対するMoAb を中和する大部 分のものは、腹部にも関係するわずかな免疫的に便能なエビトー プによるものでもないらしい;事実、ホブ ( Hopp ) 等により '(モレキュラー・イムノロジー( Hol. [mauno].)20巻、483 貝(1983年)) TFのアミノ酸配列は、多くの抗原活定基を 含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTPは、なぜ、そんなに多くの抗TP M o A b が因子ほグ M a 結合をブロックするのかを部分的に説明している。 TFは、 cDNAクローニングにより、グルコシル化を疎いて、 2 SkD。 の相路升ドメインをもつことが予想されている。それ

平成 7.12.20 発行

ゆえ抗体及び因子をノNia分子は、より小さいTFの細胞外ドメインへの結合に立体障害を示しことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水素額がおそらく機能には必要ないことから(ナカムラ ( Fron. Benost. ) 5 8 巻、1 3 5 頁(1 9 8 7 年))、コンカナバリーノ人はTF活性を阻害する(ビトリック( Pitlick )ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション( J. Clin. Invest. ) 5 5 巻、1 7 5 頁(1 9 7 5 年))という観察と一致する。

それは、誰々の御腔及び組織により発現した因子り依存委員活性は、同様の機能をもつ、1つ以上の分子様に寄因するということに、いくらか関連している。しかし、MoAbTP8~5G9は粗筋及び胎盤抽出物及び溶解した糠糠芽細胞、糠胱がん細胞及び末梢単核細胞の凝血活性を定量的に服害する。完全ではないが、これらの結果は、現にTFに寄因する補助性凝血活性は、同一ではないときも抗薬的に関連しているという結論を支持している。このことは、TPに対する単一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

最近、敗血性ショックの政死効果は、凝血プロテアーゼカスケードにおいて、中間段階での役割を果している抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質Cを往入することにより、ヒヒにおいて防ぐことができることが示されている。本研究は、TF落性を阻害するMoAbは、凝血プロテアーゼカスケードの関始のブロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と進常関連している、血気凝血因子の消費を妨ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例もで述べた58kDα型のLuTPはも7kDαのTPタンパク質と、現在では免疫化学的にまた部分的アミノ放配列により、

抗TF抗体との反応で観察された。5 8kDm パンドの一部を含む、これらマイナーな分子種は、TPと他の未同定タンパク質問で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の態様及び例を含む先の明細は、本発明の説明を意図した ものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、 修正が、本発明の精神や範囲を透脱することなく行うことができ る。 へモグロビンのアルファ 抜と同定されている。およそ12.5 k D a のポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。58 k D a のヘテロダイマーが、早期の途中で形成されているらしいので、58 k D a のパンドは、天然の細胞性TFのヘテロダイマー型であるという以前の推棄は誤りであるだろう。

ヘモグロビンのプルファ彼は、1つのシステインをもち、また TFは、 cDNAから、その細胞質ドメインに1つのシステイン を有することが予想される。またTPは、相腔外ドメインには4 個のシスティンをもつが、TF機能が選元により失なわれること から、少なくとも2つが譲内ジスルフィド結合に使われているは ずである。TPの細胞質ドメイン中の1つのシステインは、ほと んどの無限者ゾルタンパク製中のシステインのように、運元型で 雄神されているだろう。この(TPの他のシステインは、ありそ うもない)システィンは、細胞溶解後、混合ジスルフィド形成の ため容易にアクセスでき、そして、単雄操作間での酸化で、TF の細胞質及びヘモグロピンのシスティン間でジスルフィド結合が 形成すると提唱される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、別 らかに時間依存性があり、脳アセトン粉末由来のTPの非面活性 利油出と、免疫観和性マトリックスへの結合との間の時間を小さ くすることが、得られるヘテログイマーTP貴を減少させる観察 を支持する。推定される96kDaのTFダイマーも、単離の際 両様のメカニズムで形成するであろう。

沈へモグロビン抗体カラムは、3つの58kDaのヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫観和性で諸型したTF調要物中に観察できる高分子量種全てを定量的に除くことはなかった。
47kDa以上の分子量をもつ他の放酵量のマイナーバンドは、

## 講 求 の 範 闘

- (1) ヒトの組織因子重額タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずか約12,000スクレオチド塩基対を含むDNA販片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残益で 表わされるアミノ酸残益配列を有するタンパク質をコードする、 請求の範囲(1)記載のDNA新片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2回の、約130番から約918番の 塩基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、鏡求の範囲 (2) 記載のDNA断片。
- (4) 上記構造遺伝子が、第1図の約1号から約219番の残器で 表わされるアミノ放残器配列を有する可格性とト組織因子遺類 タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約786番の 塩基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、排水の範囲 (4) 記載のDNA所片。
- (6) 上記第1の配列の5、末時に連続し、かつ上記タンパク質のフミノ末時に結合した、アミノ放残器リーダ配列をコードする第2の配列も含み、かつ類第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重額前34体タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (7) 上記提成構造遺伝子が、第1図の約1者から約263署の残蓄で表わされるアミノ放残蓄配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(6)記載のDNA断片。
- (8) 上記選成構造遺伝子が、第2回の約3 (参から約9 1 8 季の 塩杏で表わされるスクレオチド塩杏配列を有する、緑ボの範囲 (7)記載のDNA断片。

- (9) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約219番の残器で表わされるアミノ放残器配列を有する、可溶性に下超 機因子重額タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(6)記 数のDNA所片。
- (10)上記湯成構造遺伝子が、第2図の約34番から約786番の 塩益で扱わされるスクレオチド塩差配列を有する、線球の範囲 (9)記載のDNA断片。
- (11) ヒト組織因子重額タンパク質をコードする構造遺伝子を定義 する第1のDNA断片に機能的に結合したベクターを合む組換 まDNA分子。
- (12)上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残器で 表わされるアミノ酸残器配列を有するタンパク質をコードする、 静球の範囲(1))記載の組換表DNA分子。
- (13)上記構造達伝子が、第2回の約130番から約918番の塩 各で表わされるヌクレオチド塩器配列を有する、請求の箱囲 (11)記載の組換えDNA分子。
- (14)さらに、上記第1の断片の5、末端に速狭し、かつ上記クンパク質に結合した、アミノ酸残器リーダー配列をコードし、かっ抜第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする選成構造遺伝子を定報する、緑求の範囲(1))記載の組換えDNA分子。
- (15)上記還成構造遺伝子が、第1回の約-32番から約263番 の残器で表わされるアミノ酸残器配列に対応するアミノ酸残器 配列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、領求の 飯囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (16)上記憶成構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の 塩基で表わられるスクレオチド塩基配列に対応するスクレオチ

(25)

H-SGITHIVAAYHLTWKSTHFKTILEWEPKPV-OH, H-TKSGDWKSKC-OH, H-EKGDWTSKC-OH, H-ECDLTDZIVKDVKQTY-OH, K-LARVTSYPAGNVESTGSAGEPLYZNSPZFTPYLC-OH, H-YZNSPZFTTPYLZTNLGPTIQSFZQUGTKV-OH, RU

からなる群から選ばれた式で変わされるとト組織因子結合部位 ポリペプチド類似物。

(26)a)ヒト組織因子重領タンパク質と免疫反応し、

H-GAVIPSRTVNRKSTDSPVEC-CH.

b)

H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC-OH,
H-VIGKDLIYTLYYWKSSSSGKKT-OH,
H-SSSGKKTANTHTHEFLIDVDKGINYCFEV-OH,
H-SGTTNTVAAYNLTWKSTHFKTLLEWEPKPV-OH,
H-TKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVXQTY-OH,
H-ECDLTDEIVKDVXQTY-OH,
H-LLRVYSYPAGNYESTGSACIPLYENSPEFTFYLC-OH,
H-YINSPEFTFYLLTNLGQPTIQSFEQVCTKV-OH, BU
H-OAVIPERTVKRKSTDSPYC-OH; BU

からなる群から選ばれた式で変わされるポリペプチドと免 時度応し、かつ

c) 第1図の第204巻から第226番の部位で示される式 で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、

抗体分子を含む、抗体組成物。

(27)上記抗体がラベルに結合している、清求の範囲(26)記載の題 成物。

## 平成 7.12.20 発行

ド塩茶配列を有する、請求の範囲(15)記載の超換えDNA分子。 (17)上記ペクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮 しうる、請求の範囲(11)記載の超換えDNA分子。

- (18)上記ベクターが、宿主部助中、上記タンパク質を発現しうる、 請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (19)上記ペクターが、宿主相論中、上記前臨体タンパク質を発現しうる、競求の範囲(14)記数の退換入DNA分子。
- (20)上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記説成構造遺伝子が、可溶型の上記前期体タンパク質をコードし、かつ、第2回の34者から786者の塩佐で乗わされるヌクレオチド記列を有する、微求の範囲(19)記載の超換えDNA分子。
- (21) わずか約50アミノ改改器を含み、かつ、

- THE PYTYDIST - . RU

- LTYNKSZSSCHRT -

からなる群から遠ばれた式で衰わされる配列に対応するアミノ 酸残毒を含む、ヒト組織因子結合部位ペプテド減収物。

(22)上記ポリペプチャム、式:

B - ANDAALAGISI - OH

で表わされる、指求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(23) 上記ポリペプチドが、式:

B-LYYMKSSSSCKET-OB

で変わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

1241

H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDMKSKC-OH, H-VFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKT-OH, &U H-SSSGKKTAKTHTHEFLIDVDKGENYCFSV-OH-

からなる野から選ばれた式で衰わされるヒト組織因子結合部位 ポリペプチド傾位物。

- (28)上記坑体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、構 次の額冊(26)知数の抗体組成物。
- (29) ヒト組織因子重領タンパク質及び第1回の28番から49番の残落で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する 抗体分子を度生する、TF8-5G9と命名されたハイブリド ーマ。
- (30) 請求の顧問(29) 記載のハイブリドーマにより歴生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (31)ヒト組織因子重複タンパク質及び、第1図の第26番から第49番の残益で示される式で表わされるポリペプチドと免疫区にする抗体分子を避生する、TP3-10H10と命名された、ハイブリドーマ。
- (32) 請求の範囲(31) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を合むモノクローナル抗体組成物。
- (33) ヒト組織因子重複及び、第1回の第146番から第167番 で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分 子を産生する、TF9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。
- (34)請求の範囲(33)記載のハイブリドーマにより度生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (35)a) 身体サンブルを、ヒト組織因子重領タンパク質と混合し、 免疫反応視合物を作る:
  - b)この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト規模 因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な時 間減搾する、そして、
- c)ステップ b) で生成した免疫反応度物の存在を検定する、 以上、 a) ~ c) のステップを含む、体液サンプル中のヒト組 液因子重項タンパク質の存在を検定する方法。

- (35)a)生理学的に許容しうる常駅制及び、血社中に存在するとト 組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合 した、ハイブリドーマTF9-10810によって産生される、ある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物 を被検者に酵源技与する。
  - b)上記投与を受けた被抗者を、上記抗体分子が、血栓の一部 として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応 座物を形成するのに十分な、予め決められた時間維持する; そして、
- c)ステップ b) で生成した免疫反応度物の存在を検定する、 以上、a) ~ c) のステップを含む生体内の血性を検出する方 - 法。
- (37) 存在するとト語機因子と効率よく結合する、TF8-5C9 及びTF9-6B4からなる静から選らんだハイブリドーマに よって度生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許 容される希釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被技体 に静原役与することを含む、生体内におけるとト組機因子の凝 血因子項/関■への結合能を中和する方法。
- (38)組成物中、因子は人はコと効率的に結合する景の、

H-EMMPYNOVYTVOISTKSGDWKSKC-OH, H-VFGKOLIYTLYYWKSSSSGKKT-OH, AU H-SSSGKKTARTWINEFLIDYDKGENYCTSV-OK...

からなる母から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に 許容された希釈剤を含むポリペプチド組成物を放牧者に静脈投 与することを含む、生体内におけるにト組織因子の最血因子リ /Wanの結合を阻害する方法。

(39) a ) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

求の範囲(42)記載の組成物。

- (46) a) 少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子経質タンパク質を含まない、生物学的語性のある ヒト組織因子重質タンパク質の水溶液を含有する組成物を含 むパッケージ、
  - を合む血管システム液体サンプル中での凝固能を検定するキットの形をした診断システム。
- (47)上記重鏡タンパク質がリン脂質中に分散している、脚次の鏡 硼(48)記載の砂筋システム。
- (48)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1回の第1者から 第219者の部位で表わされるアミノ酸残器配列を有する、環 求の額囲(46)記載の体訴システム。
- (49)\*) ヒト観機因子食質タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連抜しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残差リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、旋第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の拘取体をコードする温度構造遺伝子を定しているDNA断片と機能的に結合する、木乳類細胞に適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子でトランスホームしたホ乳類細胞の栄養増進での特美を開始する;
  - b)上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして
  - c)上記培養物から、上記成熟タンパク資を回収する、 以上、a) ~ c) のステップを含む、成熟ヒト組織因子遺譲タンパク質の理製方法。

平成 7.12.20 発行

を含むサンプル中に存在するヒト組織因子重領タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした鉢町システム。

- (40)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、
  - B) TF8-5G9.
  - b) TF9-684.
  - c) TF9-10H10

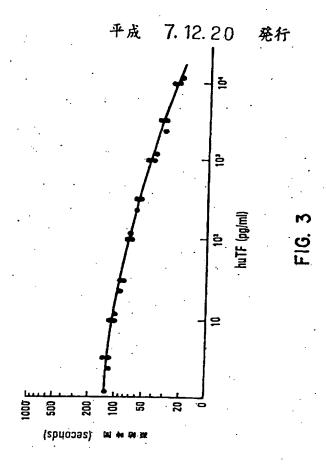
からなる舞から道ばれたハイブリドーマにより産生される、譲 球の範疇(39)記載の詮辩システム。

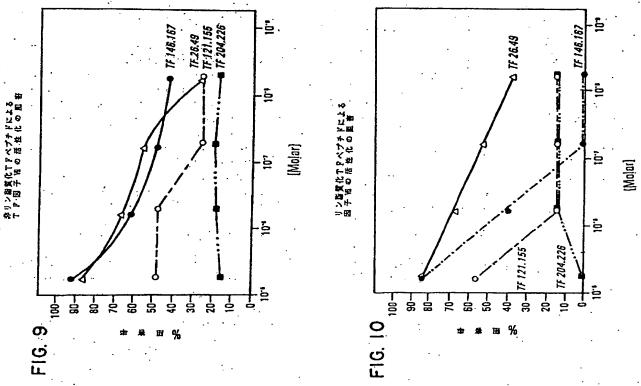
- (41) a) サンプルを、固体マトリックスに固定した、持攻の範囲 (15) 記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合し、結 合反応混合物とする、
  - b)上記結合反応減合物を、上記設宜因子が上記ポリペプチ ドと結合し、固相複合体及び上簿を形成するのに十分な時 関連技する。
  - c) 上記複合体から上記上清を分離する、及び
  - d) ステップc) の分離した複合体から、上配森血因子を囲 収する、

以上、a)~d)のステップを含む、サンプルから血液凝固因子WI/Maを果騒する方法。

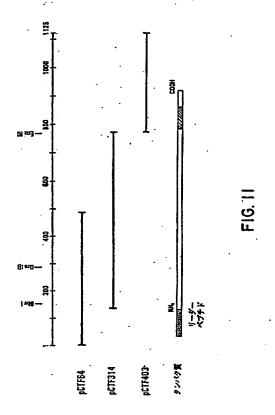
- (42)実質的に、ヒト組織因子軽額タンパク質を含まない生理学的 活性のあるヒト組織因子重額タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (43)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重領ケンパク質を、リン脂質中に分散させた、緑水の範囲(42)記載の組成物。
- (44)上記溶液が、非イオン性界面密性剤を含む、請求の範囲(42) 記載の組成物。
- (45)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から 第219季の部位で乗わされるアミノ酸残器配列を充する、請
- (50)上記遠成構造遺伝子が、第2図の第34番から第786番の 塩基で衰わされるスクレオチド塩蒸配列を有する、請求の範囲 (4灯記載の方法。
- (51) 請求の範囲(49) 記載の方法により恵生した、成熟ヒト組織因子宣復タンパク質を基本的に含む組成物。
- (52) 請求の範囲(50) 記載の方法により産生した成熟ヒト組織因子 重額タンパク質を基本的に含む組成物。
- (53) バイブリドーマTF8~5G9により産生される抗体分子を、 投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量含 有する、生理学的に許容された特収到を含む、モノクロコナル 抗体組成物を、被検者に静原投与することを含む、ヒト組織因。 子の、磁血開始距を中和する方法。
- (54)ヒト組織因子重額タンパク質及び、第1回の第26番から第49番の残基で示される式で表わされるボリベブチドと角液反応する抗体分子を建生する、TF9-5B7と命名されたハイブリドーマ。!
- (55) 排水の範囲(54) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (56)ハイブリドーマTF9-5B1により産生される依体分子を 会有する生理学的に許容された希釈剤を含む治療に効果的な量 のモノクローナル抗体組成物を、被検者に役与することを含む、 ヒト組織因子の裏面開始数を中刻する方法。
- (57) e) ヒト組織因子重線タンパク質と免疫反応し、それにより、 線タンパク質の因子リブロュへの結合能を阻害し、かつ
  - b) h u T F A : VI / VI = 複合体と免疫反応し、それにより、 核複合体の因子X活性化能を固寄する抗体分子を含む砂度 的に効果的量の、抗凝血モノクローナル抗体組成物を投与

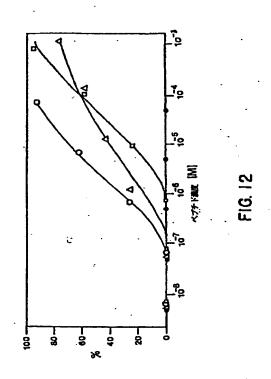
することを合む設立を超寄する方法。 (58) 上記抗体分子がさらに、ヒヒ組織因子と免疫反応を起こすこ とを特徴とする、請求の範囲(57) 記載の方法。

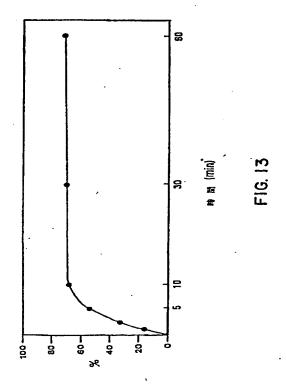


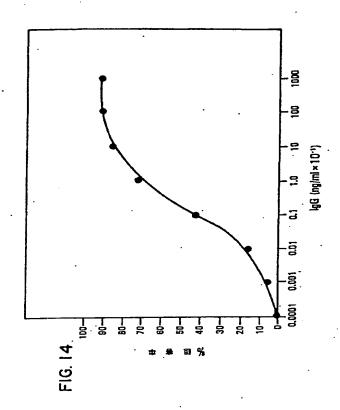


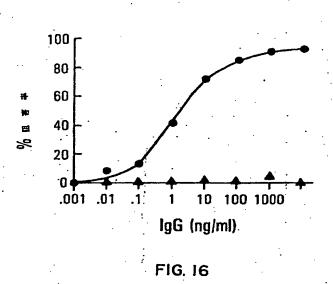
-.568-- 40-

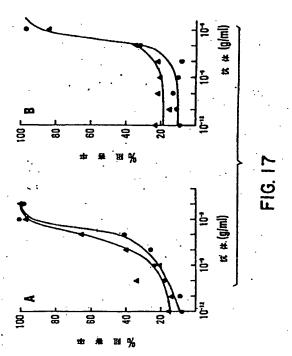












THIS PAGE BLANK (USPTO)

## This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
□ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
□ FADED TEXT OR DRAWING
□ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
□ SKEWED/SLANTED IMAGES
□ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
□ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

## IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

☐ OTHER:

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)